



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Dora Markulin

**ULOGA CpG METILACIJE GLIKO-GENA  
*MGAT3* I *MGAT5* TE GLIKOZILACIJE  
IMUNOGLOBULINA G U UPALNIM  
BOLESTIMA CRIJEVA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Dora Markulin

**CpG METHYLATION OF *MGAT3* AND  
*MGAT5* GLYCO-GENES AND  
GLYCOSYLATION OF  
IMMUNOGLOBULIN G IN  
INFLAMMATORY BOWEL DISEASES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017.

Ovaj je doktorski rad izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju, pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## **ZAHVALE**

*Najiskrenije hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Vlatki Zoldoš na pruženoj prilici, dragocjenim savjetima, te pažljivom i kritičkom čitanju rada.*

*Puno hvala Aleksandru na savjetima i pomoći pri analizama.*

*Hvala kolegama iz grupe te ostalim članovima ZMB-a na pomoći i druženju koje mi je uljepšalo vrijeme provedeno na Zavodu.*

*Posebno hvala mojim uredskim cimericama, Mariji i Vanji, na prijateljstvu, šalama i na svim znanstvenim (i manje znanstvenim) raspravama.*

*Pauli, Melaniji, Ivoni, Josipu i Luki hvala na dobrom društvu, zanimljivim razgovorima i uveseljavanju dugih dana u labosu.*

*Veliko hvala Petri na svim savjetima i korisnim raspravama. I na domaćim kolačima.*

*Hvala mojim roditeljima i sestri na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju.*

## **ULOGA CpG METILACIJE GLIKO-GENA *MGAT3* I *MGAT5* TE GLIKOZILACIJE IMUNOGLOBULINA G U UPALNIM BOLESTIMA CRIJEVA**

Dora Markulin

Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Upalne bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel diseases*, IBD) su kronične bolesti probavnog trakta koje nastaju zbog neodgovarajućeg upalnog odgovora imunološkog sustava na crijevnu mikrofloru u osoba s genetičkom predispozicijom. Cjelogenomske studije povezanosti su povezale gliko-gen *MGAT3* s glikozilacijom imunoglobulina G (IgG) i IBD-em. Druga istraživanja su s razvojem IBD-a povezala i gliko-gen *MGAT5*. Bisulfitnim pirosekvenciranjem analizirala sam metilaciju gena *MGAT3* i *MGAT5* iz krvi pacijenata s IBD-em dviju velikih neovisnih kohorti te pokazala da je metilacija ovih gena značajno promijenjena u ulceroznom kolitisu i Crohnovoj bolesti. Korelacijske analize upućuju na smanjenu ekspresiju gena *MGAT3* (kodira za enzim GnT-III) u IBD-u, ako je točna pretpostavka da su analizirana CpG mjesta unutar promotora tog gena uključena u regulaciju ekspresije. U trećoj manjoj kohorti analizirala sam metilaciju gena *MGAT3* i *MGAT5* u mononuklearnim stanicama krvi, T-limfocitima izoliranim iz krvi i iz tkiva crijeva, te pokazala značajnu promjenu metilacije oba gena u T-limfocitima iz crijeva, te promijenjenu metilaciju i ekspresiju gena *MGAT5* u T-limfocitima iz tkiva crijeva pacijenata s aktivnim oblikom ulceroznog kolitisa.

(121 stranica, 30 slika, 7 tablica, 181 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: Crohnova bolest, ulcerozni kolitis, metilacija DNA, *MGAT3*, *MGAT5*,

*N*-glikozilacija, imunoglobulin G

Mentor: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Ocjenjivači: doc. dr. sc. Petra Korać

izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

prof. dr. sc. Gordan Lauc

**CpG METHYLATION OF *MGAT3* AND *MGAT5* GLYCO-GENES AND  
GLYCOSYLATION OF IMMUNOGLOBULIN G IN INFLAMMATORY BOWEL  
DISEASES**

Dora Markulin

Faculty of Science, University of Zagreb

Inflammatory bowel diseases (IBD) are a group of intestinal disorders that occur due to inappropriate immune response to intestinal microbiome in genetically susceptible individuals. Genome wide association studies associated *MGAT3* gene with IgG glycosylation and IBD. Previous studies associated another glyco-gene, *MGAT5* with IBD, too. Methylation of *MGAT3* and *MGAT5* genes was analysed from whole blood of IBD patients from two large independent cohorts using bisulfite pyrosequencing. The results showed significant change in methylation level between patients with Crohn's disease and ulcerative colitis, and healthy controls. Correlation analysis between *MGAT3* methylation and IgG glycans suggests that *MGAT3* (coding for GnT-III enzyme) expression is reduced in IBD, if CpG sites encompassed with methylation assays are relevant for transcriptional regulation. In third cohort with smaller number of patients with ulcerative colitis, methylation of *MGAT3* and *MGAT5* genes was analysed in mononuclear cells from blood, T cells from blood, and T cells from inflamed bowel tissue. Change in methylation level of both genes was observed only in T cells from bowel tissue. The methylation and expression of *MGAT5* gene was significantly changed in T cells from bowel tissue in active ulcerative colitis.

(121 pages, 30 figures, 7 tables, 181 references, original in: Croatian)

Keywords: Crohn's disease, ulcerative colitis, DNA methylation, *MGAT3*, *MGAT5*,  
*N*-glycosylation, immunoglobulin G

Supervisor: Vlatka Zoldoš, PhD, Professor

Reviewers: Petra Korać, PhD, Assistant Professor

Ivana Ivančić Baće, PhD, Associate Professor

Gordan Lauc, PhD, Professor

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. LITERATURNI PREGLED .....	5
2.1. Upalne bolesti crijeva .....	5
2.1.1. Crijevna mikroflora u upalnim bolestima crijeva .....	5
2.1.2. Imunološki sustav u upalnim bolestima crijeva .....	6
2.1.3. Genetička osnova upalnih bolesti crijeva .....	7
2.1.4. Liječenje pacijenata s upalnim bolestima crijeva .....	8
2.2. Metilacija DNA u sisavaca .....	8
2.2.1. Uloga metilacije DNA .....	12
2.2.1.1. Uloga metilacije DNA u upalnim bolestima crijeva .....	13
2.2.2. Metilacija DNA kao biljeg bolesti .....	14
2.2.3. Analiza metilacije DNA iz krvi .....	15
2.3. Glikozilacija proteina .....	16
2.3.1. Imunoglobulin G .....	18
2.4. Gen <i>MGAT3</i> .....	19
2.5. Gen <i>MGAT5</i> .....	21
3. MATERIJALI I METODE .....	25
3.1. Materijali .....	25
3.1.1. Kemikalije .....	25
3.1.2. Komercijalni kompleti .....	25
3.1.3. Enzimi, nukleotidi, nukleinske kiseline .....	25
3.1.4. Potrošni laboratorijski materijal .....	26
3.1.5. Oprema .....	26
3.1.6. Uzorci ispitanika .....	26
3.2. Metode .....	28
3.2.1. Metode za analizu metilacije DNA .....	28
3.2.1.1. Bisulfitna konverzija .....	28
3.2.1.2. Kreiranje početnica .....	29
3.2.1.3. Lančana reakcija polimerazom .....	35
3.2.1.4. Agarozna gel elektroforeza .....	37
3.2.1.5. Pirosekvenciranje .....	37
3.2.2. Metode za analizu ekspresije gena .....	40
3.2.2.1. Reverzna transkripcija .....	40

3.2.2.2. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu .....	40
3.2.3. Analiza podataka i statistička obrada.....	41
3.2.3.1. CpG metilacija.....	41
3.2.3.2. Ekspresija gena.....	41
3.2.4. Korelacijske analize .....	42
4. REZULTATI.....	44
4.1. Analiza metilacije gena <i>MGAT3</i> i <i>MGAT5</i> uzoraka iz kohorti Edinburgh i Firenza.....	44
4.1.1. Analiza metilacije gena <i>MGAT3</i> .....	44
4.1.2. Analiza metilacije gena <i>MGAT5</i> .....	52
4.2. Korelacijske analize metilacije DNA i glikozilacije imunoglobulina G .....	59
4.3. Analiza metilacije gena <i>MGAT3</i> i <i>MGAT5</i> uzoraka iz kohorte Porto .....	62
4.3.1. Analiza metilacije gena <i>MGAT3</i> .....	62
4.3.2. Analiza metilacije gena <i>MGAT5</i> .....	79
4.4. Analiza ekspresije gena <i>MGAT5</i> uzoraka iz kohorte Porto .....	87
5. RASPRAVA.....	90
6. ZAKLJUČAK .....	105
7. LITERATURA.....	106
8. ŽIVOTOPIS .....	121



## 1. UVOD

Upalne bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel diseases*, IBD) su kronične upalne bolesti probavnog trakta koje uključuju Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis. Incidencija oboljevanja od ovih bolesti je u porastu, trenutno su neizlječive te smanjuju kvalitetu života oboljelih osoba (Cosnes i sur., 2011.). Uzrok nastanka nije u potpunosti poznat, no smatra se da nastaju zbog neodgovarajućeg upalnog odgovora imunološkog sustava na crijevnu mikrofloru u osoba s genetičkom predispozicijom za razvoj ovih bolesti (Abraham i Cho, 2009.; Xavier i Podolsky, 2007.).

Imunološki sustav je specifično kontroliran glikozilacijom proteina s obzirom da su većina ključnih molekula uključenih u imunološki odgovor glikoproteini (Rudd i sur., 2001.). Istraživanja su pokazala da je glikozilacija raznih proteina (onih prisutnih u serumu, transmembranskih glikoproteina, itd.) promijenjena u upalnim bolestima crijeva (Theodoratou i sur., 2014.). U serumu pacijenata s ulceroznim kolitisom je zabilježena povećana razina visoko sijaliniziranih razgranatih *N*-glikana, kao i biantenarnih glikana bez galaktoze (Miyahara i sur., 2013.). Također, smanjena galaktozilacija imunoglobulina G (IgG) otkrivena je u pacijenata koji boluju od IBD-a, s jače izraženim promjenama u Crohnovoj bolesti u odnosu na ulcerozni kolitis (Dubé i sur., 1990.; Trbojević Akmačić i sur., 2015.).

Imunoglobulin G jedan je od ključnih efektorâ imunološkog sustava, a proizvode ga plazma stanice nastale aktivacijom i diferencijacijom B-limfocita. Na svojoj Fc regiji ima samo jedno glikozilacijsko mjesto, te njegova glikozilacija značajno mijenja strukturu i funkciju ove molekule. Ako se na rasijecajući N-acetilglukozamin glikanske strukture prisutne na Fc regiji IgG-a veže galaktoza i sijalinska kiselina, antitijelo će imati protuupalnu funkciju (Arnold i sur., 2007.; Böhm i sur., 2014.; Janeway Jr. i sur., 2001.; Kaneko i sur., 2006.; Karsten i sur., 2012.). Stoga, smanjenjem galaktozilacije i sijalinizacije IgG poprima proupalnu funkciju u IBD-u, a isti je mehanizam primijećen i u drugim upalnim bolestima poput sistemskog lupusa i reumatoidnog artritisa (Parekh i sur., 1985.; Vučković i sur., 2015.).

Cjelogenomska studija povezanosti (engl. *Genome Wide Association Studies*, GWAS) identificirala je 16 gena koji su povezani s glikozilacijom IgG-a (Lauc i sur., 2013.), a među njima je i gen *MGAT3*. Ovaj gen su GWA studije prethodno povezale i s Crohnovom bolesti

(Franke i sur., 2010.). Pleiotropnost povezanosti gena *MGAT3* s glikozilacijom IgG-a i Crohnovom bolesti upućuje da bi gen *MGAT3* mogao biti uključen u ovu bolest kroz aberantnu glikozilaciju IgG-a. Gen *MGAT3* kodira za enzim N-acetilglukozaminiltransferazu III (GnT-III) koji prenosi N-acetilglukozamin (GlcNAc) na  $\beta$ 1,4-vezanu manozu u srži glikana sastavljenu od tri manoze *N*-glikana te na taj način proizvodi rasijecajući GlcNAc. Rasijecajući GlcNAc nije supstrat za ostale glikoziltransferaze (GnT-II, GnT-IV, GnT-V, FUT8) pa njegov dodatak na *N*-glikansku strukturu rezultira supresijom daljnjeg procesiranja i elongacije glikana (Miwa i sur., 2012.). U pacijenata s ulceroznim kolitisom je značajno promijenjena ekspresija još jednog gliko-gena, *MGAT5* (Dias i sur., 2014.) koji kodira za enzim N-acetilglukozaminiltransferazu V (GnT-V). Ovaj enzim prenosi GlcNAc na  $\beta$ 1,6-vezanu manozu u srži od tri manoze *N*-glikana pri čemu nastaje razgranata struktura *N*-glikana. Glikozilacija posredovana enzimom GnT-V ima ulogu u funkciji imunološkog sustava, posebice u aktivaciji T-limfocita i signalizaciji putem njihovih receptora (engl. *T-cell receptor*, TCR) (Marth i Grewal, 2008.). U pacijenata s ulceroznim kolitisom smanjena je razina mRNA gena *MGAT5*, a također i produkta njegovog djelovanja,  $\beta$ 1,6-razgranatih *N*-glikana na receptorima T-limfocita u tkivu crijeva (Dias i sur., 2014.).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da na upalne bolesti crijeva veliki utjecaj ima okoliš (Bonaz i Bernstein, 2013.; Kinnucan i sur., 2013.; Mahid i sur., 2006.; Sonnenberg, 1990.), te bi stoga epigenetički mehanizmi, kao poznati medijatori faktora iz okoliša i ekspresije gena (Feil i Fraga, 2012.), mogli imati veliku ulogu u razvoju i progresiji ovih bolesti. Relativno veliki broj radova ističe važnu ulogu metilacije DNA u IBD-u. Dosadašnje cjelogenomske metilacijske studije povezanosti (engl. *Epigenome Wide Association Study*, EWAS) su identificirale brojne gene povezane s IBD-em od kojih su neki uključeni u regulaciju upale, aktivaciju imunološkog sustava i održavanje stanične adhezije (Häsler i sur., 2012.; Nimmo i sur., 2012.; Saito i sur., 2011.). Otkriveno je da i same DNA metiltransferaze DNMT3B i DNMT1, odgovorne za *de novo* metilaciju i održavanje metilacijskog statusa DNA, imaju povećanu ekspresiju u tkivu sluznice crijeva s mjesta upale pacijenata s ulceroznim kolitisom (Saito i sur., 2011.).

Pokazano je da je promjena u *N*-glikozilaciji imunoglobulina G važan element u upalnim bolestima uključujući upalne bolesti crijeva. Hipoteza istraživanja provedenog u ovoj doktorskoj disertaciji je da bi epigenetička deregulacija (promjena metilacije DNA) gena *MGAT3* i *MGAT5*, mogla biti korelirana s promjenom glikozilacije IgG-a u IBD-u.

Glavni cilj bio je utvrditi povezanost promjene CpG metilacije gliko-gena *MGAT3* i *MGAT5* s promjenama glikozilacije IgG molekula u serumu periferne krvi pacijenata oboljelih od IBD-a. Drugi cilj bio je utvrditi da li promjena metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* ima potencijal biljega iz krvi u ovoj bolesti. Stupanj metilacije CpG mjesta u genima *MGAT3* i *MGAT5* analiziran je na bisulfitno konvertiranoj DNA iz krvi (u dvije neovisne kohorte pacijenata), B-limfocita te T-limfocita izoliranih iz krvi, te T-limfocita izoliranih iz tkiva crijeva pacijenata s IBD-em (u trećoj neovisnoj kohorti pacijenata).

Specifični ciljevi istraživanja bili su:

1. Analiza CpG metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* u krvi pacijenata oboljelih od IBD-a
2. Korelacija metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* iz krvi s *N*-glikanima na IgG-u izoliranom iz seruma istih pacijenata oboljelih od IBD-a
3. Analiza CpG metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* u B-limfocitima izoliranim iz krvi pacijenata oboljelih od IBD-a
4. Analiza CpG metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* u krvi i T-limfocitima izoliranim iz krvi i tkiva crijeva s mjesta upale istih pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa
5. Usporedba obrasca metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* u T-limfocitima izoliranim iz krvi s obrascima metilacije istih gena u krvi i u T-limfocitima izoliranim iz tkiva crijeva s mjesta upale pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa
6. Analiza ekspresije gena *MGAT5* u T-limfocitima izoliranim iz krvi i tkiva crijeva s mjesta upale istih pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa
7. Usporedba metilacije i ekspresije gena *MGAT5* u T-limfocitima iz tkiva crijeva s mjesta upale istih pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa

Ovo istraživanje dio je projekta EU FP7 IBD-BIOM („*Diagnostic and prognostic biomarkers for inflammatory bowel disease*“, koordinator prof. dr. sc. Jack Satsangi, University of Edinburgh, UK) te su analize metilacije DNA i glikozilacije IgG-a provedene na uzorcima pacijenata dviju kohorti kliničkih centara u Edinburghu (Western General Hospital, Edinburgh, UK) i Firenzi (University Hospital Careggi, Firenza, Italija). Za pacijente koji su uključeni u ova istraživanja dostupni su genetički, biokemijski, metabolički i drugi podaci. Metilacija DNA iz T-limfocita iz krvi i tkiva crijeva s mjesta upale analizirana je na uzorcima pacijenata kohorte Porto u suradnji sa Zavodom za gastroenterologiju Bolničkog centra Santo Antoio u Portu (Portugal). Za određivanje metilacije DNA koristila se metoda pirosekvenciranja nakon bisulfitne konverzije DNA, kojom se može odrediti stupanj metilacije pojedinačnih CpG mjesta. Za analizu ekspresije gena *MGAT5* iz T-limfocita iz krvi i tkiva crijeva pacijenata s IBD-em kohorte Porto koristio se kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (engl. *quantitative real time polymerase chain reaction*, RT-qPCR) upotrebom hidrolizirajućih proba. Analiza N-glikana na Fc regiji imunoglobulina G napravljena je u suradnji sa znanstveno-istraživačkim laboratorijem Genos. Glikani IgG-a su analizirani primjenom metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) i tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (engl. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*, LC-MS). Korelacijske analize stupnjeva metilacije DNA i glikozilacije IgG-a napravljene su u programskom paketu R.

Rezultati ovih istraživanja doprinijet će razumijevanju molekularnih mehanizama razvoja i progresije upalnih bolesti crijeva kroz promijenjenu funkciju glavnog elementa imunološkog sustava, molekula IgG-a, uzrokovanu promjenom IgG glikozilacije. Korelacijske analize metilacije gliko-gena *MGAT3* i *MGAT5* i glikozilacije IgG-a iz krvi pacijenata s IBD-em mogle bi pokazati da li je epigenetička regulacija ova dva gena važna za uspostavljanje glikozilacijskog uzorka na Fc regiji IgG-a.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel diseases*, IBD) su kronične upalne bolesti probavnog trakta koje uključuju Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis. Javljaju se obično u ranoj odrasloj dobi te traju čitav život. Tijek ovih bolesti je karakteriziran periodima u kojima je bolest izražena te periodima remisije, no moguća je i kontinuirana aktivnost. Učestalost ovih bolesti je sve veća u svijetu, trenutno su neizlječive te smanjuju kvalitetu života oboljelih osoba (Cosnes i sur., 2011.). Unatoč značajnom napretku razumijevanja ovih bolesti, točan uzrok još uvijek nije poznat. Smatra se da nastaju zbog neodgovarajućeg upalnog odgovora imunološkog sustava na crijevnu mikrofloru u osoba s genetičkom predispozicijom za razvoj ovih bolesti (Abraham i Cho, 2009.; Xavier i Podolsky, 2007.). Također, sve više istraživanja ukazuje da na razvoj IBD-a utječu i okolišni faktori povezani s modernim načinom života. Primjerice, Mahid i sur. (2006.) su proveli meta-analizu o povezanosti pušenja i IBD-a te zaključili da veći rizik za obolijevanje od Crohnove bolesti imaju osobe koje su aktivni pušači, dok osobe koje su prestale pušiti, imaju veći rizik za obolijevanje od ulceroznog kolitisa. Nadalje, Shaw i sur. (2010.) su istraživali utjecaj korištenja antibiotika u prvoj godini života na razvoj IBD-a u djetinjstvu te zaključili da je moguća povezanost između povećanog korištenja antibiotika i povećane incidencije pedijatrijskog IBD-a. Na razvoj IBD-a utječe i konzumacija voća i povrća. Naime, veća konzumacija voća i povrća je povezana s manjim rizikom obolijevanja od Crohnove bolesti u djece (Amre i sur., 2007.). Na povećanje broja oboljelih od IBD-a utječe i stres, smanjena fizička aktivnost i smanjena kvaliteta sna (Bonaz i Bernstein, 2013.; Kinnucan i sur., 2013.; Sonnenberg, 1990.). Nijedan od navedenih faktora nije dovoljan da samostalno dovede do razvoja IBD-a, već je potrebna sinergija genetičkih faktora rizika s promjenama crijeвне mikroflоре, te utjecajem vanjskih okolišnih faktora što povećava kompleksnost ovih bolesti (Ananthakrishnan, 2015.). Međutim, molekularni mehanizmi koji dovode do razvoja ovih bolesti još uvijek su nedovoljno poznati, te nedostaju pouzdani biljezi za ranu dijagnozu, prognozu i liječenje (Vermeire i sur., 2006.).

#### 2.1.1. Crijevna mikroflora u upalnim bolestima crijeva

Crijevna mikroflora se u čovjeka uspostavlja pri rođenju, mijenja se brzo tijekom prve godine života te nakon tog perioda obično ostaje stabilna, ali moguće su promjene zbog utjecaja okolišnih faktora ili bolesti (Abraham i Cho, 2009.). Sadrži više od  $10^{14}$

mikroorganizama, od kojih je najviše bakterija (Kaser i sur., 2010.). Ima oko 1150 vrsta bakterija pri čemu je oko 160 prisutno u svakom pojedincu (Qin i sur., 2010.). Više od 90% crijevne mikroflore čine koljena bakterija Bacteroidetes i Firmicutes, dok ostali dio čine koljena Proteobacteria (koji sadrži rod *Escherichia* i *Helicobacter*) i Actinobacteria, te virusi i gljivice (Kaser i sur., 2010.). U osoba koje boluju od IBD-a je prisutna disbioza bakterija, odnosno promjena normalne crijevne mikroflore (de Souza i Fiocchi, 2016.). Primjećena je smanjena raznolikost bakterijskih vrsta, ali i promijenjen sastav (Zhang i Li, 2014.). Vidljivo je povećanje broja bakterija iz koljena Proteobacteria, a smanjenje broja iz koljena Firmicutes, dok podaci za bakterije iz koljena Bacteroidetes nisu konzistentni (Andoh i sur., 2011.; Frank i sur., 2007.; Gophna i sur., 2006.; Rehman i sur., 2010.). Zanimljivo je smanjenje broja bakterija iz roda *Clostridium* (koljeno Firmicutes) u Crohnovoj bolesti bez obzira na stadij bolesti, dok je ova promjena vidljiva samo u aktivnom obliku ulceroznog kolitisa što upućuje da je sastav bakterija crijevne mikroflore u inaktivnom obliku ulceroznog kolitisa sličiji sastavu bakterija normalne crijevne mikroflore (Andoh i sur., 2011.). Unatoč brojnim dosadašnjim istraživanjima, još uvijek nije potpuno razjašnjeno da li je disbioza bakterija crijevne mikroflore odgovorna za nastanak IBD-a ili pak sama bolest dovodi do disbioze bakterija (Chassaing i Darfeuille-Michaud, 2011.). Iako bakterije zauzimaju većinski udio crijevne mikroflore, razvoj IBD-a nije ograničen isključivo na disbiozu bakterija, već bi važnu ulogu mogli imati i virusi te gljivice (Ananthakrishnan, 2015.).

### 2.1.2. Imunološki sustav u upalnim bolestima crijeva

Stanice domaćina i brojni mikrobi koji naseljuju crijevni lumen su u stalnoj komunikaciji. Upravo ta komunikacija omogućuje održavanje imunološke homeostaze. Imunološki sustav mora pružiti organizmu obranu od patogena i previsoke koncentracije crijevnih mikroba, no s druge strane, mora omogućiti toleranciju na već postojeće mikrobe crijeva. Smatra se da narušavanje ove ravnoteže može dovesti do nastanka IBD-a. Obrambeni mehanizmi koje koriste stanice urođene imunosti uključuju korištenje receptora za prepoznavanje uzorka (engl. *pattern recognition receptors*, PRRs). Ovi receptori prepoznaju očuvane strukture mikroorganizama nazvane molekularni uzorci povezani s patogenima (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Postoje različite vrste receptora PRRs ovisno o vrsti liganda kojeg prepoznaju te o lokaciji na kojoj se nalaze pa stoga, različiti receptori mogu aktivirati različite signalne puteve. Prepoznavanje mikroba putem PRRs dovodi do aktivacije citokinskih i kemokinskih signalnih puteva, stvaranja antimikrobnih

proteina, fagocitoze, autofagije, reaktivnih kisikovih i dušičnih vrsta. Dolazi i do aktivacije pomoćničkih T-limfocita 17 (Th17) koji potom luče interleukin IL-23 i ostale citokine što pridonosi upali tkiva. Povećana razina IL-23 i nekih drugih citokina koje luče stanice Th17 je primijećena u Crohnovoj bolesti i u ulceroznom kolitisu. Nadalje, u probavnom sustavu zdravih ljudi, B-limfociti izlučuju visoke razine imunoglobulina A (IgA) koji imaju ulogu u obrani od različitih crijevnih patogena, no u sluznici zahvaćenoj upalom oboljelih od IBD-a je primijećeno smanjeno izlučivanje IgA, a povećano izlučivanje IgG-a. Naseljavanje velikog broja neutrofila je jedna od glavnih karakteristika IBD-a. Općenito, u IBD-u je prisutna aktivacija odgovora stečene imunosti. Još uvijek nije u potpunosti jasno na koji način imunološki sustav razlikuje patogene od već postojećih crijevnih mikroba. Osim obrambenih mehanizama, imunološki sustav mora omogućiti i toleranciju na postojeće mikrobe crijeva. Mehanizmi tolerancije uključuju mehanizme koji smanjuju izlaganje mikroba imunološkom sustavu i koji smanjuju imunološki odgovor putem različitih unutar- i izvanstaničnih mehanizama (Abraham i Cho, 2009.; Abraham i Medzhitov, 2011.; de Souza i Fiocchi, 2016.; Mizoguchi i Bhan, 2012.).

### *2.1.3. Genetička osnova upalnih bolesti crijeva*

Genetička predispozicija je jedan od rizičnih faktora za razvoj IBD-a. Genetičke studije su pokazale da je veća pojavnost ovih bolesti u obiteljima i među jednojajčanim blizancima (Ek i sur., 2014.). Provođenjem cjelogenomskih studija povezanosti (engl. *Genome Wide Association Studies*, GWAS), postignut je značajan napredak u otkrivanju genetičke osnove IBD-a (Anderson i sur., 2011.; Franke i sur., 2010.; Liu i sur., 2015.). Ove studije uzimaju u obzir varijacije jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) koje su zastupljene u populaciji s više od 1% (Khor i sur., 2011.). Meta-analizama podataka generiranih GWA studijama, koje su uključivale različite populacije ljudi, identificirano je 200 genskih lokusa povezanih s IBD-em (Liu i sur., 2015.). Od toga je 37 lokusa povezano s Crohnovom bolesti, 27 s ulceroznim kolitisom, dok je 137 povezano s oba tipa bolesti (Jostins i sur., 2012.; Liu i sur., 2015.). Velik broj rizičnih lokusa povezanih s oba oblika IBD-a (Crohnovom bolesti i ulceroznim kolitisom) ukazuje da gotovo svi mehanizmi uključeni u jedan tip bolesti imaju neku ulogu i u drugom tipu bolesti (Jostins i sur., 2012.). Prvi otkriveni rizični gen za Crohnovu bolest je *NOD2* (Ogura i sur., 2001.). Proteinski produkt ovog gena je receptor koji prepoznaje muramil dipeptid (engl. *muramyl dipeptide*, MDP), očuvani motiv peptidoglikana bakterija. Aktivacija receptora dovodi do autofagije i

utječe na urođeni i stečeni imunološki odgovor (Zhang i Li, 2014.). Gubitak funkcije *NOD2* rezultira pojačanom upalom zbog nedovoljnog uništavanja bakterija (de Souza i Fiocchi, 2016.). Zanimljivo je da rizični aleli *NOD2* pokazuju protektivni učinak u ulceroznom kolitisu (Jostins i sur., 2012.). S Crohnovom bolesti su povezani i SNP-ovi u genima *ATG16L1* i *IRGM* koji također imaju ulogu u autofagiji pri čemu je *IRGM* povezan i s ulceroznim kolitisom što ukazuje na važnost autofagije u oba tipa bolesti, iako je više izražena u Crohnoj bolesti (Hoefkens i sur., 2013.; Jostins i sur., 2012.). Nadalje, GWA studije su povezale IBD s *IL23R* koji kodira za receptor proupalnog citokina IL-23. Osim uloge u autofagiji te odgovoru urođene i stečene imunosti, otkriveni rizični geni za IBD imaju ulogu i u održavanju epitelne barijere (Liu i sur., 2015.).

#### *2.1.4. Liječenje pacijenata s upalnim bolestima crijeva*

Liječenje pacijenata koji boluju od upalnih bolesti crijeva uključuje promjenu načina života, operativne zahvate i terapiju lijekovima. Pacijenti pokazuju heterogen odgovor na terapiju i trenutno ne postoji univerzalna terapija za ove bolesti. Samo neki od lijekova koji su danas u upotrebi su protuupalni lijekovi poput aminosalicilata i kortikosteroida, imunomodulatori te anti-TNF terapija. Cilj liječenja više nije samo ublažavanje simptoma bolesti, već se sve više ide u smjeru razvoja terapije koja će spriječiti daljni razvoj bolesti i moguće komplikacije (Moss, 2015.; Neurath, 2017.; Williams i sur., 2011.; Zenlea i Peppercorn, 2014.). Identifikacija mehanizama koji se odvijaju u ovim bolestima može dovesti do razvoja novih vrsta terapije i biljega za određivanje uspješnosti terapije što će omogućiti individualiziran pristup liječenju i time osigurati kvalitetniji način života pacijenata.

## **2.2. Metilacija DNA u sisavaca**

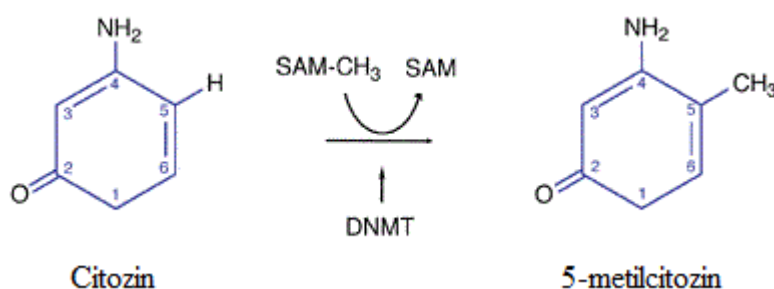
Metilacija DNA je jedna od najstabilnijih i najbolje proučenih epigenetičkih oznaka. U genomu sisavaca, metilacija DNA se uglavnom odvija na citozinima koji prethode gvaninima te podrazumijeva kovalentni dodatak metilne skupine na petu poziciju (C5) pirimidinskog prstena citozina. Metilna skupina metiliranog oblika citozina, 5-metilcitozina (5mC), ne utječe na promjenu sekvence DNA, a samim time ni na komplementarno sparivanje citozina s gvaninom. Zanimljivo je da su CpG dinukleotidi u genomu sisavaca zastupljeni 5-10 puta manje u odnosu na ostale dinukleotide. S obzirom da je otprilike 80% CpG dinukleotida u genomu metilirano, smatra se da je razlog deplecije CpG dinukleotida mutageno svojstvo



metiliranog citozina. Naime, spontanom deaminacijom 5mC nastaje timin koji je sparen s gvaninom. Nasuprot tome, deaminacija nemetiliranog citozina u uracil se događa 2-4 puta sporije u odnosu na deaminaciju 5mC u timin te je popravak uracila učinkovitiji od popravka timina (Bird, 1980.; Bird, 2011.; Jurkowska i sur., 2011.). Nadalje, distribucija CpG dinukleotida u genomu nije jednolika, već postoje dijelovi genoma bogati CpG dinukleotidima, tzv. CpG otoci. CpG otoci su definirani kao područja veća od 200 pb s udjelom G+C baza većim od 50% i omjerom opaženih naspram očekivanih CpG dinukleotida većim od 60% (Gardiner-Garden i Frommer, 1987.). CpG otoci se nalaze u promotorskim regijama oko 60%-70% gena genoma čovjeka. Većina CpG otoka nalazi se u hipometiliranom stanju, no nije jasan mehanizam koji održava hipometilirano stanje CpG otoka tijekom uspostave globalne *de novo* metilacije u razvoju embrija. Moguće je da enzimi demetilaze uklanjaju metilne skupine s 5mC ili da transkripcijski faktori, vezani u području CpG otoka, sterički ometaju vezanje DNA metiltransferaza na isto područje. Iako je većina CpG otoka hipometilirana, određeni CpG otoci poprimaju metilirano stanje tijekom normalnog razvoja (Illingworth i Bird, 2009.). Bez obzira na obrazac metilacije, stupanj metilacije CpG otoka se održava stabilnim kroz stanične diobe (Bird, 2002.). Metilacija CpG otoka unutar promotorske regije povezuje se s represijom transkripcije (Illingworth i Bird, 2009.). Iako još uvijek nije potpuno razjašnjena uloga intragenske metilacije izvan promotorske regije, sve više istraživanja upućuje na pozitivnu korelaciju između metilacije i transkripcijske aktivnosti (Jones, 2012.; Laurent i sur., 2010.; Yang i sur., 2014.).

U genomu sisavaca, uzorak metilacije DNA se uspostavlja tijekom razvoja embrija te se održava tijekom diobe stanica i replikacije genoma (Li i Bird, 2007.). Reakciju metilacije DNA kataliziraju enzimi DNA metiltransferaze (DNMT) koji koriste S-adenozil-L-metionin (AdoMet ili SAM) kao donor metilne skupine koji se prevodi u S-adenozil-L-homocistein (AdoHcy ili SAH) nakon prijenosa metilne skupine na 5C-atom citozina (Slika 1). U sisavaca postoje tri aktivne DNA metiltransferaze- DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, i jedna bez katalitičke aktivnosti, DNMT3L (Jurkowska i sur., 2011.). Navedene DNMT imaju neka svojstva zajednička, a neka različita. Primjerice, sve DNMT se sastoje od N-terminalne domene koja ima regulatorne funkcije te od C-terminalne katalitičke domene (Cheng, 1995.). Osim konzervirane strukture, proteini porodice DNMT imaju sličnosti i u načinu djelovanja. Naime, ovi enzimi stvaraju kovalentnu vezu s ciljanom bazom, potpuno ju izokreću iz uzvojnice DNA te ju zatim umeću u aktivno mjesto enzima (Klimasauskas i sur., 1994.). Dvije su glavne različitosti DNMT. Prvo, izolirana katalitička domena DNMT1 ne pokazuje

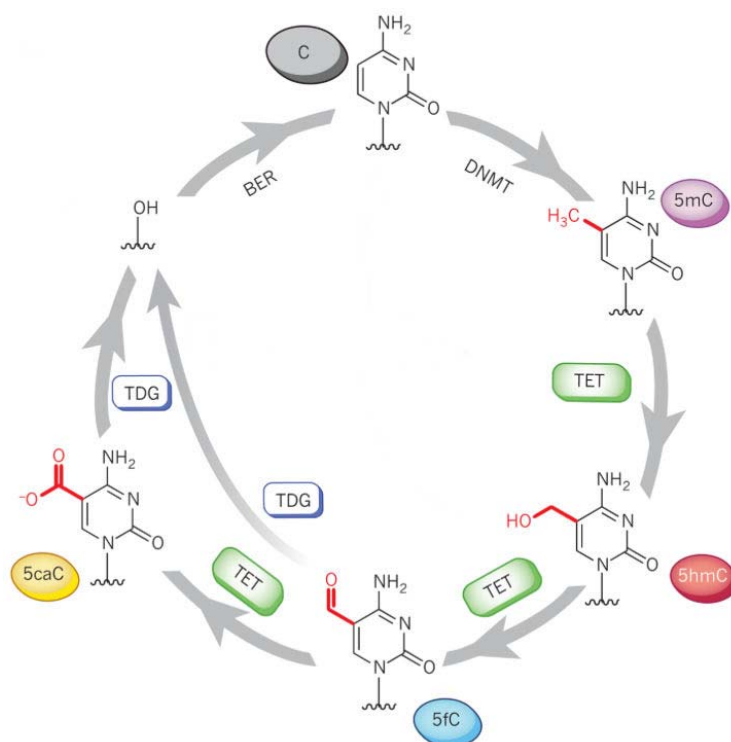
enzimatske sposobnosti (Fatemi i sur., 2001.) što znači da je potrebna interakcija N- i C-terminalne domene za aktivaciju enzima (Jurkowska i sur., 2011.), dok je izolirana forma C-katalitičke domene DNMT3A i DNMT3B enzimatski aktivna (Gowher i Jeltsch, 2002.). Drugo, enzimi se razlikuju prema supstratu kojeg metiliraju. DNMT1 je zadužena za održavanje uzorka metilacije te preferencijalno metilira hemimetiliranu DNA (Goyal i sur., 2006.) tijekom replikacije DNA (Leonhardt i sur., 1992.). Enzimi DNMT3A i DNMT3B su odgovorni za uspostavljanje uzorka metilacije DNA *de novo* tijekom gametogeneze i razvoja pri čemu imaju jednaku preferenciju prema hemimetiliranoj i nemetiliranoj DNA (Gowher i Jeltsch, 2002.; Okano, 1998.). DNMT3L uspostavlja slabu vezu s DNA, ne može vezati SAM te je katalitički inaktivan enzim, međutim djeluje kao pozitivan regulator DNMT3A i DNMT3B tako što direktno interagira s katalitičkim domenama ovih dvaju enzima te stimulira njihovu aktivnost (Chen i sur., 2005.; Gowher i sur., 2005.). Osim toga, enzim DNMT3L prepoznaje nemetilirani lizin na poziciji 4 repa histona H3 i inducira *de novo* metilaciju DNA tako što regrutira ili aktivira DNMT3A (Ooi i sur., 2007.). Jones i Liang (2009.) su nedavno predložili modificiranu verziju dosadašnjeg jednostavnog modela uspostave i održavanja metilacije DNA na temelju eksperimentalnih podataka koji se nisu slagali s dosadašnjim modelom. Iako DNMT3A i DNMT3B primarno djeluju kao *de novo* DNMT, zanimljivo je da ovi enzimi mogu djelovati zajedno s DNMT1 u održavanju obrasca metilacije DNA (Liang i sur., 2002.). Također, aktivnost metiltransferaze održavateljskog tipa DNMT1 je potrebna za *de novo* metilaciju DNA (Jair i sur., 2006.).



**Slika 1. Shematski prikaz metilacije citozina.** Enzim DNA metiltransferaza (DNMT) katalizira reakciju metilacije citozina pri čemu koristi S-adenozil-L-metionin (SAM) kao donor metilne skupine te nastaje 5-metilcitozin. (Slika preuzeta i prilagođena s <http://journals.cambridge.org>.)

Metilacija DNA je reverzibilna, a demetilacija citozina može se odvijati na pasivan ili aktivan način. U slučaju kada je aktivnost DNMT održavateljskog tipa inhibirana, govori se o pasivnoj demetilaciji koja rezultira gubitkom metilacije za 50% nakon svakog ciklusa

replikacije DNA. Nasuprot tome, aktivna demetilacija se odvija neovisno o replikaciji DNA te je za nju potrebna enzimatska aktivnost (Jurkowska i sur., 2011.). Proteini koji imaju ulogu u demetilaciji su enzimi TET (engl. *ten-eleven translocation*), TDG (engl. *thymine DNA glycosylase*) i AID (engl. *activation-induced cytidine deaminase*). Otkriće enzima porodice TET (Tahiliani i sur., 2009.) je uveliko doprinijelo razumijevanju procesa demetilacije DNA. Enzimi TET konvertiraju 5mC u 5-hidroksimetilcitozin (5hmC) putem oksidacije, no 5hmC se može dalje oksidirati do 5-formilcitozina (5fC) i 5-karboksilcitozina (5caC) (Kohli i Zhang, 2013.). Enzim TDG mehanizmom izrezivanja baza uklanja deaminirani produkt 5mC (T) i deaminirani produkt djelovanja TET-a- 5hmC (5hmU) (Cortellino i sur., 2011.). Enzim TDG može direktno izrezati 5fC i 5caC, derivate nastale djelovanjem TET-a, pri čemu će se izrezana baza tijekom procesa popravka DNA zamijeniti nemodificiranim C (Slika 2) (Kohli i Zhang, 2013.). U procesu demetilacije, sudjeluje i enzim AID koji ima mogućnost konverzije 5mC u T čime nastaje krivo spareni par T:G (Morgan i sur., 2004a.). Ova greška se zatim popravljaju enzimima glikozilazama pri čemu se T tijekom procesa popravka DNA izrezuje i zamjenjuje nemetiliranim C (Kohli i Zhang, 2013.). Poznato je da DNMT3A i DNMT3B djeluju kao *de novo* DNA metiltransferaze te da zajedno s DNMT1 mogu djelovati u održavanju obrasca metilacije (Liang i sur., 2002.), no nedavno je predložena i uloga ovih dvaju enzima u procesu demetilacije. Métivier i sur. (2008.) su pokazali da se enzimi DNMT3A i DNMT3B regrutiraju u području promotora na početku svakog ciklusa transkripcije u vrijeme demetilacije CpG dinukleotida unutar promotora te da pokazuju deaminaznu aktivnost *in vitro*. Stoga su predložili da ove DNA metiltransferaze svojom deaminaznom aktivnošću direktno utječu na proces demetilacije. Ipak, autori ne isključuju mogućnost da su enzimi DNMT3A i DNMT3B potrebni za regrutiranje neke druge deaminaze, koja trenutno još nije otkrivena.



**Slika 2. Shematski prikaz procesa metilacije i oksidativne demetilacije.** Enzim DNA metiltransferaza (DNMT) katalizira reakciju metilacije citozina (C) u 5-metilcitozin (5mC). Putem oksidacije, enzimi TET konvertiraju 5mC u 5-hidroksimetilcitozin (5hmC) te daljnjom oksidacijom u 5-formilcitozin (5fC) i 5-karboksilcitozin (5caC). Enzim TDG direktno izrezuje 5fC i 5caC pri čemu će se izrezana baza tijekom procesa popravka DNA (BER) zamijeniti nemodificiranim C. Uklanjanje deaminiranog produkta 5mC (T) i deaminiranog produkta djelovanja TET-a 5hmC (5hmU) pomoću TDG nije prikazano na slici. (Slika preuzeta i prilagođena iz Kohli i Zhang (2013.).)

### 2.2.1. Uloga metilacije DNA

Metilacija DNA ima ključnu ulogu u brojnim staničnim procesima. Pravilno uspostavljen obrazac metilacije je esencijalan za razvoj embrija. Metilacija DNA je uključena u uspostavljanje i održavanje obrasca tkivno specifične ekspresije gena tijekom razvoja. Također, važna je za utišavanje transkripcije gena, inaktivaciju X-kromosoma, održavanje genomske utiske, kao i održavanje integriteta genoma putem utišavanja retrovirusa i transpozona i ostalih mobilnih elemenata. Pokazano je da metilacija DNA utječe i na stabilnost te održavanje broja kromosoma (Li i Bird, 2007.). Narušen obrazac metilacije DNA podloga je mnogih bolesti. Primjerice, mutacije u genu za DNA metiltransferazu DNMT3B rezultiraju smanjenom metiltransferaznom aktivnošću što dovodi do nastanka sindroma imunodeficijencije, centromerne nestabilnosti i anomalija lica (engl. *immunodeficiency, centromeric region instability, and facial anomalies syndrome*, ICF) (Xu i sur., 1999.).

Međutim, do aberantne metilacije citozina može doći i zbog gubitka metilne skupine ili pak hipermetilacije u regijama koje bi trebale biti demetilirane. Takva sporadična, ili pak okolišem uvjetovana promjena metilacije promotora određenih gena, može se dogoditi tijekom odrasle dobi jedinke te je u korijenu mnogih multifaktorijskih bolesti od kojih danas oboljeva veliki dio ljudske populacije. Promijenjen obrazac metilacije DNA vidljiv je u različitim tumorima koje uglavnom karakterizira globalna hipometilacija genoma i hipermetilacija CpG otoka u promotoru tumor-supresorskih gena. Hipometilacija DNA dovodi do kromosomske nestabilnosti, reaktivacije transpozona i onkogenih te gubitka genomskog utiska, dok hipermetilacija tumor-supresorskih gena utječe na utišavanje ekspresije ovih gena te time pridonosi nekontroliranoj staničnoj proliferaciji (Esteller, 2008.; Gopalakrishnan i sur., 2008.).

#### *2.2.1.1. Uloga metilacije DNA u upalnim bolestima crijeva*

GWA studije identificirale su 200 genskih lokusa povezanih s upalnim bolestima crijeva (Liu i sur., 2015.), međutim mnoge osobe ipak ne oboljevaju od IBD-a unatoč postojanju navedenih polimorfizama gena (Kelly i Alenghat, 2016.) što ukazuje da, uz genetičku osnovu, na razvoj IBD-a utječu i drugi faktori. U prilog tome govore i epidemiološka istraživanja koja su identificirala povezanost između okolišnih faktora i rizika za razvoj ulceroznog kolitisa i/ili Crohnove bolesti (Ananthakrishnan, 2015.; Mishkin, 1997.; Rubin i Hanauer, 2000.). Epigenetički mehanizmi, između ostalih metilacija DNA, priznati su medijatori između okoliša i ekspresije gena te su u podlozi mnogih kompleksnih bolesti (Relton i Smith, 2010.). U otkrivanju epigenetičke osnove upalnih bolesti crijeva, postignut je značajan napredak provođenjem cjelogenomskih metilacijskih studija povezanosti (engl. *Epigenome Wide Association Study*, EWAS). Nedavno su Häsler i sur. (2012.) proveli EWAS na DNA iz tkiva crijeva 20 jednojajčanih blizanaca od kojih je samo jedan bolovao od ulceroznog kolitisa. Identificiran je 61 gen s promijenjenom metilacijom pri čemu su neki od gena uključeni u regulaciju upale. Upravo ovakve studije na jednojajčanim blizancima, od kojih je samo jedan od blizanaca obolio od bolesti, predstavljaju iznimno koristan pristup u proučavanju uloge epigenetičkih mehanizama u multifaktorijskim bolestima jer su isključeni neki čimbenici koji bi mogli utjecati na razvoj bolesti kao što su dob, spol, genetički faktori (Castillo-Fernandez i sur., 2014.). Druga je studija pokazala da je u čak 84% slučajeva samo jedan od jednojajčanih blizanaca obolio od ulceroznog kolitisa, odnosno u 65% slučajeva od

Crohnove bolesti što može ukazivati na to da je genetički utjecaj značajniji u Crohnovoj bolesti (Spehlmann i sur., 2008.).

Nimmo i sur. (2012.) su identificirali 1117 CpG mjesta u stanicama periferne krvi koja su diferencijalno metilirana u Crohnovoj bolesti, te su izdvojili 50 gena s najznačajnije promijenjenom CpG metilacijom od kojih su neki uključeni u aktivaciju imunološkog sustava. Povišeni stupanj metilacije pokazala je grupa analiziranih gena u tkivu upaljene sluznice crijeva pacijenata s ulceroznim kolitisom (Saito i sur., 2011.). Od gena koji imaju višu metilaciju u tkivu koje je zahvaćeno upalom, značajno je spomenuti gen *CDH1* koji kodira za E-kadherin, stanični adhezijski protein za koji je poznato da ima smanjenu ekspresiju u tkivu crijeva. Stoga, moguće je da hipermetilacija gena *CDH1* pridonosi smanjenoj transkripciji te time dovodi do smanjene učinkovitosti epitelne barijere što može dovesti do prodora bakterija i upale (Kelly i Alenghat, 2016.). Smatra se da su u razvoj IBD-a uključene i promjene u genima za DNA metiltransferaze. DNA metiltransferaze DNMT1 i DNMT3B imaju veću ekspresiju u tkivu sluznice crijeva s upalom u odnosu na neupaljenu sluznicu pacijenata s ulceroznim kolitisom pri čemu veću ekspresiju pokazuje DNMT1 u odnosu na DNMT3B (Saito i sur., 2011.). Iako je GWA studija identificirala *DNMT3A* kao rizični lokus za razvoj Crohnove bolesti (Franke i sur., 2010.), u tkivu sluznice crijeva pacijenata s ulceroznim kolitisom nije zabilježena povećana ekspresija ove DNA metiltransferaze (Saito i sur., 2011.). Stoga, smatra se da je metilacijski status u Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu kontroliran različitim mehanizmima (Low i sur., 2013.).

### 2.2.2. Metilacija DNA kao biljeg bolesti

Biljeg je biološka karakteristika koju je moguće objektivno izmjeriti te služi kao indikator normalnog biološkog procesa, patološkog procesa ili kao indikator odgovora na određenu terapiju (Naylor, 2003.). Biljezi se uglavnom dijele na biljege probira te dijagnostičke, prognostičke i terapijske biljege. Biljezi probira ukazuju na predispoziciju za obolijevanje od određene bolesti, dijagnostički biljezi omogućuju ranu detekciju i dijagnozu bolesti, prognostički biljezi daju informaciju o preživljenju pacijenata ukoliko boluju od bolesti koja nije liječena, dok terapijski biljezi identificiraju odgovor pacijenta na terapiju (Mikeska i Craig, 2014.). Analiza epigenetičkih promjena je veoma korisna jer omogućuje otkrivanje veze između bolesti i stila života te okolišnih čimbenika. Razvoj biljega temeljenih na epigenetičkim promjenama se najviše oslanja na metilaciju DNA. Razlog tome je relativna

stabilnost ove modifikacije te relativno jednostavna analiza pomoću trenutno postojećih tehnologija (Bock, 2009.). Također, ukoliko obrazac metilacije DNA reflektira obrazac ekspresije gena, koja je promijenjena u određenoj bolesti, tada se očekuje da je i profil metilacije DNA specifičan za tu bolest (Levenson, 2010.). Danas je sve više istraživanja koja idu u smjeru korištenja metilacije DNA kao dijagnostičkog, prognostičkog ili terapijskog biljega. Primjerice, u 80%-90% pacijenata koji boluju od malignog tumora prostate je prisutna hipermetilacija gena *GSTPI*, koji kodira za enzim glutation S-tranferazu, dok hipermetilacija nije vidljiva u dobroćudnom hiperplastičnom tkivu prostate. Stoga, detekcija metilacije gena *GSTPI* može pomoći u razlikovanju malignog tumora prostate od dobroćudnog procesa. Nadalje, hipermetilacija tumor-supresorskih gena može biti prognostički indikator u pacijenata koji boluju od malignih tumora pa je tako hipermetilacija gena *p16<sup>INK4a</sup>* povezana s lošim ishodom pacijenata koji boluju od kolorektalnog karcinoma. Hipermetilacija gena kandidata može služiti kao indikator odgovora pacijenta na određenu terapiju. Hipermetilacija gena *MGMT*, koji kodira za protein uključen u popravak DNA, povezana je s povoljnim odgovorom pacijenata koji boluju od glioma na kemoterapijske lijekove karmustin ili temozolomid (Esteller, 2008.). Metilacijski testovi su danas komercijalizirani za mnoge gene, poput metilacije gena *GSTPI* kao dijagnostički biljeg za rano otkrivanje malignog tumora prostate te metilacije gena *MGMT* kao terapijski biljeg za glioblastom. Također, komercijalizirani su metilacijski testovi za gen *VIM* (kodira za protein vimentin uključen u održavanje oblika stanice i stabilizaciju interakcija citoskeleta) i gen *SEPT9* (kodira za protein septin-9 uključen u formiranje citoskeleta) koji su dijagnostički biljezi za kolorektalni karcinom (Li i sur., 2014.; Mikeska i Craig, 2014.; Payne, 2010.). Iako su dosadašnje analize metilacije DNA kao potencijalnog biljega bile uglavnom koncentrirane na istraživanje malignih tumora (Bock, 2009.), danas je sve više studija koje pokazuju postojanje specifičnog obrasca metilacije DNA i u genetičkim, neurološkim i psihijatrijskim bolestima (Levenson, 2010.).

### 2.2.3. Analiza metilacije DNA iz krvi

Metilacija DNA se može analizirati iz različitih vrsta tkiva i tjelesnih tekućina. Kako je metilacija DNA tkivno specifična, najvjerodostojniji rezultati se mogu dobiti analizom tkiva pogođenog bolesti, no većina tkiva je teško dostupna te su metode uzorkovanja invazivne. Stoga, u analizama metilacije DNA, posebice u dijagnostičke svrhe, kao izvor DNA se koristi krv ili ostale lako dostupne tjelesne tekućine i tkiva (Mikeska i Craig, 2014.).

Prednost krvi je što je u doticaju sa svim tkivima, metoda uzorkovanja krvi je manje invazivna za pacijenta te je izolacija DNA iz krvi relativno jednostavna. Iz krvi se može dobiti slobodna DNA (engl. *cell-free circulating DNA*) koja cirkulira u plazmi, ili se DNA izolira iz stanica periferne krvi. Koncentracija slobodne DNA u krvi je niska, stoga je ograničavajuće njeno korištenje u analizi metilacije DNA. Nasuprot tome, DNA iz leukocita je prisutna u većoj količini (Levenson i Melnikov, 2012.), no rezultate analize je teško interpretirati s obzirom na heterogenost metilacije u različitim staničnim tipovima. Svaki stanični tip ima vlastiti obrazac metilacije DNA (Reinius i sur., 2012.) pa se postavlja pitanje da li obrazac metilacije DNA iz krvi reflektira obrazac metilacije DNA u tkivu u kojem se odvija patogeneza. Iako su potrebna još mnoga istraživanja kako bi se utvrdilo može li se metilacija DNA koristiti kao dijagnostički, prognostički ili terapijski biljeg iz krvi, u ovom području je postignut napredak. Primjerice, Toperoff i sur. (2012.) su otkrili specifičnu promjenu obrasca metilacije gena *FTO* u krvi u pacijenata s dijabetesom tipa 2 prije prvih simptoma bolesti i potencijal ovog gena kao molekularnog biljega za rano otkrivanje bolesti. Heyn i sur. (2013.) su analizirali CpG metilaciju iz krvi jednojajčanih blizanki od kojih je samo jedna bolovala od karcinoma dojke. Otkrili su da je hipermetilacija gena *DOK7* prisutna godinama prije dijagnoze što ukazuje na obećavajuću ulogu metilacije ovog gena kao biljega iz krvi za rano otkrivanje karcinoma dojke. Brojne druge publikacije pokazuju da se aberantna metilacija DNA može detektirati iz krvi ljudi oboljelih od karcinoma i drugih bolesti (Al-Moundhri i sur., 2010.; Dempster i sur., 2011.; Nile i sur., 2008.; Nimmo i sur., 2012.).

### **2.3. Glikozilacija proteina**

Glikozilacija proteina je složen ko-translacijski i post-translacijski mehanizam vezanja složenih šećernih struktura (glikana) na proteine pomoću enzima glikoziltransferaza. Razlikuju se dva glavna tipa glikozilacije proteina, *N*- i *O*- vezana glikozilacija, ovisno da li je glikan vezan na dušikov (N) ili kisikov (O) atom aminokiselina. Proces glikozilacije se odvija u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu nakon čega se nastali glikoproteini transportiraju u različite stanične organele, staničnu membranu ili se izlučuju iz stanice. Glikani se nalaze na površini svih stanica te su sastavni dio gotovo svih membranskih i sekretornih proteina, uključujući komponente imunološkog sustava. Iako su male molekulske mase, strukturno su vrlo kompleksni te je za njih karakteristična nelinearna razgranata forma. Za razliku od proteina, proces biosinteze glikana nije kontroliran direktno kalupom DNA, već u procesu njihova nastajanja sudjeluje više stotina proteina koji su u međusobnoj interakciji



unutar kompleksnih puteva. Promjene u aktivnosti i/ili lokalizaciji enzima uključenih u biosintezu glikana utječu na konačnu strukturu glikana. Glikani utječu na mnoga svojstva glikoproteina poput konformacije, fleksibilnosti, naboja i hidrofilnosti te su stoga uključeni u različite biološke procese kao što su aktivacija receptora, prijenos signala, endocitoza, stanična diferencijacija i stanična adhezija (Gornik i sur., 2012.; Moran i sur., 2011.; Moremen i sur., 2012.; Ohtsubo i Marth, 2006.; Takahashi i sur., 2009.). Na važnost ispravne glikozilacije proteina ukazuje činjenica da je potpuni nedostatak *N*-glikana letalan u razvoju embrija (Marek i sur., 1999.). Promjene u glikozilaciji su povezane s mnogim vrstama bolesti poput infektivnih bolesti, malignih tumora, neuroloških poremećaja, dijabetesa i upalnih bolesti (Gornik i Lauc, 2008.; Moran i sur., 2011.; Ohtsubo i Marth, 2006.; Stowell i sur., 2015.; Testa i sur., 2015.; Theodoratou i sur., 2014.).

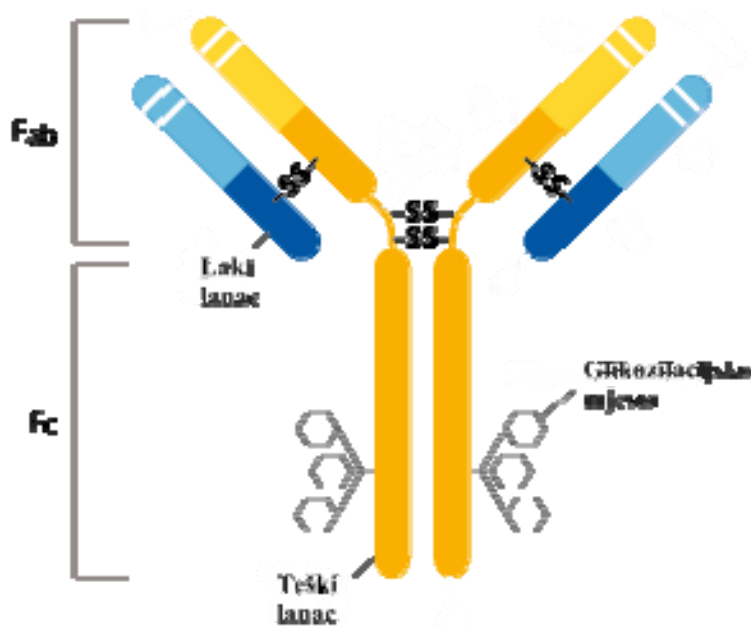
Probavni sustav je gusto prekriven mukusom čija su glavna komponenta mucini, veliki i visoko glikozilirani glikoproteini. Mucini su prisutni kao transmembranski i sekretorni proteini. Transmembranski mucini sudjeluju u signalizaciji preko stanične površine, a mogu djelovati i kao difuzna barijera u probavnom sustavu. S druge strane, glikani sekretornih mucina vežu molekule vode pri čemu nastaje prepoznatljiva karakteristika mukusa, sluz koja vlaži i štiti probavni trakt. Najzastupljeniji sekretorni mucin u tankom i debelom crijevu je MUC2. Ovaj mucin je obilno *O*-glikoziliran što omogućuje zaštitu od probavnih proteaza (Johansson i sur., 2013.). Mucini imaju važnu ulogu u IBD-u što je vidljivo iz primjera mišjeg modela s inaktiviranim *Muc2* gdje su miševi razvili teži oblik kolitisa (Van der Sluis i sur., 2006.). Važna je i pravilna glikozilacija mucina što dokazuje činjenica da su miševi, kojima su nedostajali određeni *O*-glikani, razvili kolitis nalik ulceroznom kolitisu u ljudi (Fu i sur., 2011.). Poznato je da mukus štiti epitelne stanice od mikrobnih, enzimskih i mehaničkih ozljeda te služi kao fizička barijera u borbi protiv mikroba. Upravo glikani imaju zaštitnu ulogu mukusa (Johansson i sur., 2013.). Nekoliko studija je pokazalo da je u pacijenata s aktivnim oblikom ulceroznog kolitisa smanjen sadržaj ugljikohidrata u mukusu u odnosu na zdrave ljude i pacijente u remisiji (Clamp i sur., 1981.; Holmén Larsson i sur., 2011.). Najveće promjene u *O*-glikozilaciji glikoproteina MUC2 su primjećene uglavnom u pacijenata s najtežim oblikom ulceroznog kolitisa, dok se u pacijenata u remisiji glikanski profil vratio u normalno stanje što ukazuje da bi smanjena glikozilacija MUC2 u IBD-u mogla biti povezana s upalom (Holmén Larsson i sur., 2011.). Globalno smanjenje glikozilacije mucina u IBD-u bi moglo značiti da smanjen sadržaj ugljikohidrata ili povećana razina jednostavnih glikana dovode do povećanog kontakta bakterija s crijevnim epitelom što za

posljedicu može imati upalu karakterističnu za IBD. Još uvijek nije potpuno razjašnjena molekularna osnova promijenjene glikozilacije MUC2, međutim čini se da je promjenama zahvaćen i Golgijev aparat u kojem se odvija proces glikozilacije te je stoga moguće da je glikozilacija promijenjena i na nekim drugim glikoproteinima koje luče epitelne stanice (Swidsinski i sur., 2007.; Theodoratou i sur., 2014.). U serumu pacijenata s ulceroznim kolitisom je zabilježena povećana razina visoko sijaliniziranih razgranatih *N*-glikana, kao i biantenarnih glikana bez galaktoze. Nadalje, glikanske promjene korelirane su s aktivnošću bolesti u slučaju ulceroznog kolitisa (Miyahara i sur., 2013.). Osim toga, s IBD-em je povezan genetički polimorfizam u genu *HNF4a* koji regulira ekspresiju nekoliko fukoziltransferaza (Barrett i sur., 2009.) te u genu *FUT2* koji je odgovoran za dodavanje fukoze na glikoproteine (McGovern i sur., 2010a.).

### 2.3.1. Imunoglobulin G

Imunoglobulini su veliki glikoproteini koje proizvode plazma stanice nastale aktivacijom i diferencijacijom B-limfocita. Imunoglobulini imaju ulogu u obrani organizma na način da prepoznaju antigene mikroorganizama (Janeway Jr. i sur., 2001.; Schroeder i Cavacini, 2010.). Od pet klasa imunoglobulina (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM), imunoglobulin G (IgG) najzastupljenija je klasa u ljudskoj krvi i predstavlja ~ 75% svih imunoglobulina. IgG se sastoji od dva teška i dva laka lanca međusobno povezana disulfidnim vezama u stukturu oblika slova Y (Slika 3). Građen je od dvije domene, Fab i Fc. Preko domene Fab veže antigen, dok se preko domene Fc veže za receptore (engl. *Fc receptors*, FcR) na površini stanica imunološkog sustava (Sompayrac, 2012.). Imunološki sustav je usko kontroliran glikozilacijom proteina s obzirom da su većina ključnih molekula uključenih u imunološki odgovor glikoproteini pri čemu je IgG jedan od ključnih efektoru imunološkog sustava (Arnold i sur., 2007.; Rudd i sur., 2001.). IgG molekula ima samo jedno glikozilacijsko mjesto u domeni Fc na svakom od dva teška lanca (Arnold i sur., 2007.). Smatra se da *N*-glikani vezani u domeni Fc održavaju otvorenu konformaciju molekule što omogućuje vezanje IgG-a za receptore FcR (Krapp i sur., 2003.). U prilog tome govori činjenica da deglikozilirani IgG nema mogućnost vezanja za receptore (Bolt i sur., 1993.; Friend i sur., 1999.). Iako postoji samo jedno mjesto za vezanje *N*-glikana, teorijski može nastati više od 900 različitih glikoformi IgG-a (Fujii i sur., 1990.). Najmanja promjena glikanske strukture na tom mjestu može značajno utjecati na strukturu i funkciju IgG-a. Stoga, ovisno o glikanskoj strukturi koja se nalazi na Fc-mjestu, IgG može imati proupalnu ili pak protuupalnu funkciju

(Böhm i sur., 2014.; Kaneko i sur., 2006.). Protuupalna aktivnost IgG-a je posredovana Fc-galaktozilacijom, stoga bi smanjena Fc-galaktozilacija mogla doprinijeti patogenezi upalnih bolesti (Theodoratou i sur., 2014.). Smanjena galaktozilacija IgG-a je primjećena u pacijenata koji boluju od IBD-a, reumatoidnog artritisa i nekih drugih kroničnih upalnih bolesti (Dubé i sur., 1990.; Gornik i Lauc, 2008.; Parekh i sur., 1985.; Trbojević Akmačić i sur., 2015.). Također, protuupalna aktivnost IgG-a je posredovana i prisutnošću terminalno vezane sijalinske kiseline (Kaneko i sur., 2006.). GWA studija glikoma IgG-a je identificirala 16 gena koji su povezani s glikozilacijom IgG-a (Lauc i sur., 2013.). Mnogi od tih gena su prethodno povezani s autoimunim bolestima (npr. reumatoidni artritis, Gravesova bolest) (Chu i sur., 2011.; Stahl i sur., 2010.) i hematološkim malignim bolestima (npr. Hodgkinov limfom) (Cozen i sur., 2012.), a pet gena (*BACH2*, *MGAT3*, *IKZF1*, *IL6ST*, *LAMB1*) s upalnim bolestima crijeva (Barrett i sur., 2008.; Franke i sur., 2010.; Jostins i sur., 2012.; McGovern i sur., 2010a.).

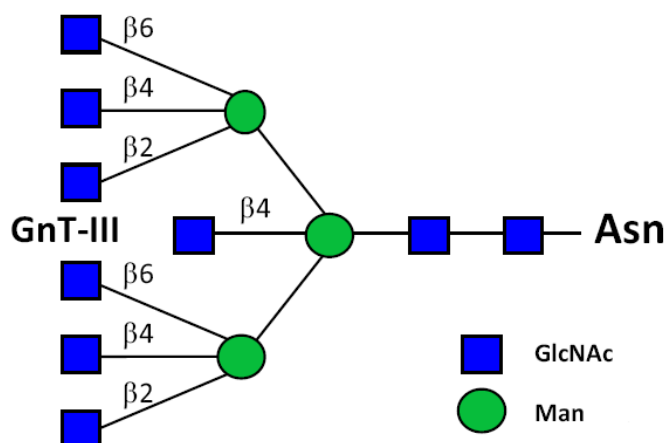


**Slika 3. Shematski prikaz strukture imunoglobulina G (IgG).** IgG se sastoji od dva teška i dva laka lanca međusobno povezana disulfidnim vezama (SS) koji čine dvije domene, Fab i Fc. U domeni Fc se nalazi jedno glikozilacijsko mjesto. (Slika preuzeta i prilagođena s <http://www.ebioscience.com>.)

## 2.4. Gen *MGAT3*

Gen *MGAT3* kodira za enzim N-acetilglukozaminiltransferazu III (GnT-III) koji prenosi N-acetilglukozamin (GlcNAc) na  $\beta$ 1,4-vezanu manozu u srži glikana sastavljenu od

tri manoze *N*-glikana, te na taj način proizvodi rasijecajući GlcNAc (Slika 4). Dodatak rasijecajućeg GlcNAc-a mijenja sastav, ali i konformaciju *N*-glikana (Stanley, 2002.). GnT-III se smatra ključnom glikoziltransferazom u biosintezi *N*-glikana s obzirom da rasijecajući GlcNAc nije supstrat za ostale glikoziltransferaze (GnT-II, GnT-IV, GnT-V, FUT8) pa njegov dodatak rezultira supresijom daljnjeg procesiranja i elongacije *N*-glikana, poput  $\beta$ 1,6-GlcNAc razgranatih struktura koje katalizira enzim GnT-V (Miwa i sur., 2012.; Pinho i Reis, 2015.; Zhao i sur., 2006.). Nadalje, za razliku od ostalih GlcNAc *N*-glikana, rasijecajući GlcNAc se ne elongira ili se minimalno elongira. Stoga, smanjena ili povećana ekspresija GnT-III značajno mijenja strukturu *N*-glikana (Kizuka i Taniguchi, 2016.).



**Slika 4. Shematski prikaz djelovanja N-acetilglukozaminiltransferaze III (GnT-III).** GnT-III prenosi N-acetilglukozamin (GlcNAc) na  $\beta$ 1,4-vezanu manozu (Man) u srži *N*-glikana koja se sastoji od tri manoze. (Slika preuzeta i prilagođena iz Takahashi i sur. (2016.).)

Yoshimura i sur. (1995.) su pokazali da je GnT-III uključen u supresiju metastaza. Transfekcija gena *MGAT3* u stanice melanoma miša, koje imaju visoki metastatski potencijal, rezultirala je značajnim smanjenjem  $\beta$ 1,6-GlcNAc razgranatih struktura koje katalizira enzim GnT-V (s kojim je GnT-III u kompeticiji) i značajnoj supresiji metastaza pluća u miša, nakon injektiranja transfeciranih stanica u miša. Također, pokazali su da je rasijecajući GlcNAc prisutan na E-kadherinu u stanicama melanoma miša transfeciranim s *MGAT3* te da je povećana adhezija između stanica (engl. *cell-cell adhesion*) što upućuje da glikozilirani E-kadherin pridonosi supresiji metastaza u takvim stanicama (Yoshimura i sur., 1996a.). Također, ekspresija GnT-III je povezana sa supresijom epitelno-mezenhimalne tranzicije (engl. *epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT) (Pinho i Reis, 2015.). S druge strane,

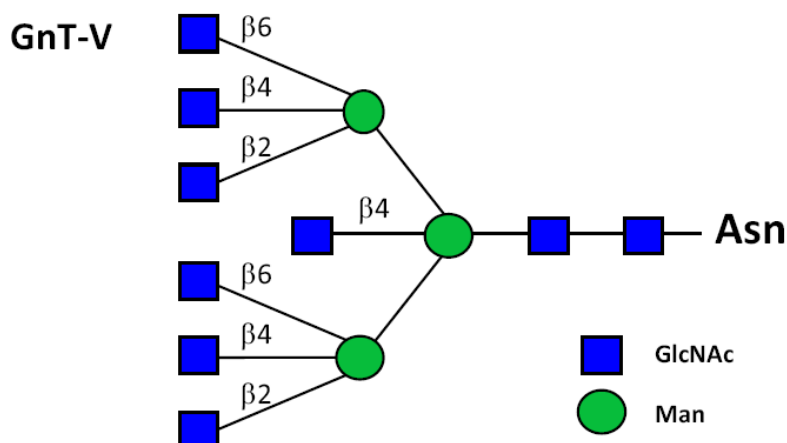
miševi s nedostatkom GnT-III su pokazivali smanjenu progresiju tumora jetre (Yang i sur., 2003.). Isto tako, pokazano je da stanice leukemije s prekomjernom ekspresijom GnT-III koloniziraju slezenu miša (Yoshimura i sur., 1996b.) što ukazuje na to da GnT-III ne djeluje uvijek kao supresivni faktor tumora, već da može sudjelovati i u povećanju progresije tumora. Točan uzrok ovakve dvojake uloge GnT-III u tumorima još uvijek nije u potpunosti razjašnjen (Kizuka i Taniguchi, 2016.).

Smatra se da GnT-III ima potencijalnu ulogu u kontroli staničnog rasta i signalizaciji putem faktora rasta s obzirom da se rasijećajući GlcNAc veže za EGFR (engl *epidermal growth factor receptor*), koji je često dereguliran u stanicama malignih tumora i igra važnu ulogu u kontroli stanične proliferacije (Miwa i sur., 2012.). Poznato je da se u stanicama malignih tumora na *N*-glikane, primjerice E-kadherina, veže rasijećajući GlcNAc, produkt djelovanja GnT-III, no još uvijek nisu dovoljno istraženi mehanizmi koji reguliraju ekspresiju GnT-III u stanicama malignih tumora. Kohler i sur. (2016.) su po prvi put pokazali povezanost epigenetičke regulacije ekspresije *MGAT3* putem metilacije DNA te prisutnost rasijećajućeg GlcNAc na *N*-glikanima za koji je odgovoran GnT-III.

Osim u malignim tumorima, čini se da gen *MGAT3* ima ulogu i u neurološkim bolestima. Povišena razina mRNA *MGAT3* pronađena je u mozgu pacijenata *post mortem* koji su bolovali od Alzheimerove bolesti što upućuje da GnT-III i njegov produkt, rasijećajući GlcNAc, imaju ulogu u razvoju ove bolesti (Akasaka-Manya i sur., 2010.; Takahashi i sur., 2016.).

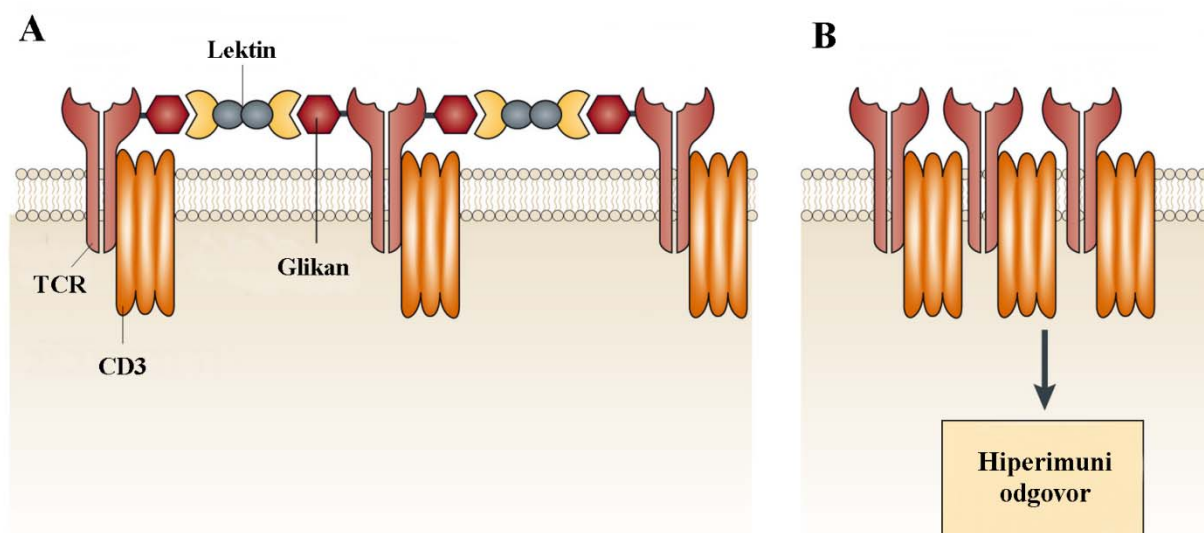
## 2.5. Gen *MGAT5*

Gen *MGAT5* kodira za enzim N-acetilglukozaminiltransferazu V (GnT-V) koji prenosi N-acetilglukozamin (GlcNAc) na  $\beta$ 1,6-vezanu manozu u srži od tri manoze *N*-glikana pri čemu nastaje razgranata struktura *N*-glikana (Slika 5). Za razliku od rasijećajućeg GlcNAc (kojeg dodaje GnT-III), koji se ne elongira ili se minimalno elongira, GlcNAc kojeg dodaje GnT-V se može dalje elongirati dodatkom uglavnom galaktoze i sijalinske kiseline i polilaktozamina, ponavljajućih disaharidnih jedinica *N*-acetillaktozamina (sastoje se od GlcNAc i galaktoze) (Kizuka i Taniguchi, 2016.). Uz GnT-III, GnT-V predstavlja glavnu glikoziltransferazu uključenu u biosintezu *N*-glikana.



**Slika 5. Shematski prikaz djelovanja N-acetilglukozaminiltransferaze V (GnT-V).** GnT-V prenosi N-acetilglukozamin (GlcNAc) na  $\beta$ 1,6-vezanu manozu (Man) u srži N-glikana koja se sastoji od tri manoze. (Slika preuzeta i prilagođena iz Takahashi i sur. (2016.).)

Glikozilacija posredovana enzimom GnT-V ima ulogu u funkciji imunološkog sustava, posebice u aktivaciji T-limfocita i signalizaciji putem njihovih receptora (engl. *T-cell receptor*, TCR) (Marth i Grewal, 2008.). Tijekom homeostaze, aktivacija T-limfocita potiče ekspresiju gena *MGAT5* što rezultira glikozilacijom TCR-a posredovane s GnT-V (Chen i sur., 2009.). Nastali razgranati N-glikan obično sadrži polilaktozamin koji je ligand za lektine iz obitelji galektina (Garner i Baum, 2008.; Kizuka i Taniguchi, 2016.). Međutim, miševi kojima je *MGAT5* bio utišan, nisu mogli sintetizirati  $\beta$ 1,6-razgranate N-glikane, a samim time nije došlo do vezanja lektina. To je za posljedicu imalo značajno udruživanje TCR-a što je dovelo do smanjenog praga njihove aktivacije i hiperimunog odgovora (Slika 6) (Demetriou i sur., 2001.; Morgan i sur., 2004b.). Takvi miševi su razvili povećanu osjetljivost na autoimune bolesti (autoimuni encefalomijelitis, engl. *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*, EAE; mišji model za multiplu sklerozu). Stoga, deregulacija *MGAT5* bi mogla povećati osjetljivost ljudi na autoimune bolesti poput multiple skleroze (Demetriou i sur., 2001.).



**Slika 6. Shematski prikaz aktivacije T-limfocita posredovane s aktivnošću GnT-V.** **A)** Tijekom homeostaze, receptori T-limfocita (TCR, u kompleksu s CD3) su glikozilirani razgranatim *N*-glikanima djelovanjem GnT-V te su na glikane vezani lektini. **B)** Gubitak glikoziltransferazne aktivnosti GnT-V rezultira neprisutnošću razgranatih *N*-glikana i lektina na TCR-u što uzrokuje udruživanje TCR-a te dovodi do smanjenog praga njihove aktivacije i hiperimunog odgovora. (Slika preuzeta i prilagođena iz Marth i Grewal (2008.).)

GnT-V ima ulogu i u progresiji tumora. Razvoj malignih tumora je dijelom karakteriziran mogućnošću tumorske stanice da nadvlada stanične adhezije te invadira okolno tkivo. E-kadherin je transmembranski glikoprotein koji ima ulogu u staničnoj adheziji (Pinho i Reis, 2015.) te je njegova disfunkcija jedan od glavnih faktora u progresiji tumora (Birchmeier i Behrens, 1994.). Pokazano je da u staničnoj liniji malignog tumora želuca povećana ekspresija *MGAT5* rezultira dodatkom  $\beta$ 1,6-razgranatih *N*-glikana na E-kadherin što ima za posljedicu destabilizaciju E-kadherina te njegovu relokalizaciju sa stanične membrane u citoplazmu. Ovakav događaj dovodi do nekorektno uspostavljenih i nefunkcionalnih veza između stanica (engl. *adherens junctions*) što narušava staničnu adheziju (Pinho i sur., 2013.) te time pridonosi invazivnosti tumora i metastaziranju primarnog tumora (Pinho i Reis, 2015.). U prilog tome da GnT-V ima ulogu u progresiji tumora govori i istraživanje u kojem je primjećena povećana količina  $\beta$ 1,6-razgranatih *N*-glikana u kolorektalnom karcinomu i karcinomu dojke (Fernandes i sur., 1991.).

Dias i sur. (2014.) su predstavili prijedlog novog molekularnog mehanizma koji sudjeluje u patogenezi ulceroznog kolitisa. Pokazali su da pacijenti koji boluju od ulceroznog kolitisa imaju smanjenu razinu  $\beta$ 1,6-razgranatih *N*-glikana na receptorima T-limfocita u tkivu

crijeva u usporedbi sa zdravim ljudima. Smanjena razina grananja *N*-glikana na TCR-ovima je prethodno povezana s povećanom aktivacijom T-limfocita i hiperimunim odgovorom (Slika 6) (Demetriou i sur., 2001.; Morgan i sur., 2004b.). Pacijenti s težim oblikom bolesti su imali najniže razine grananja *N*-glikana na TCR-ovima u usporedbi s pacijentima koji su imali blaži ili inaktivni oblik bolesti. Također, razina mRNA *MGAT5* bila je niža u pacijenata s ulceroznim kolitisom što upućuje da smanjena ekspresija *MGAT5* potiče promjenu imunološkog odgovora putem promjene u grananju *N*-glikana na TCR-ovima. Smanjena razina grananja *N*-glikana na TCR-ovima kao posljedica smanjene ekspresije *MGAT5* (koja je ujedno pozitivno povezana sa stadijem bolesti) ukazuje da bi se *MGAT5* mogao koristiti za određivanje osjetljivosti ljudi za obolijevanje od ulceroznog kolitisa te samim time i u terapijske svrhe (Dias i sur., 2014.).



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

U ovom istraživanju je korišteno: agaroz (Sigma), 20x TaqMan Gene Expression Assay (*HMBS*- Hs00609297\_m1, *MGAT5*- Hs00159136\_m1) za umnažanje cDNA RT-qPCR-om (Applied Biosystems), 2x TaqMan Gene Expression Master Mix za umnažanje cDNA RT-qPCR-om (Applied Biosystems), AccuGENE H<sub>2</sub>O (Lonza), etanol (Kefo), etidijev bromid (Carl Roth), etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA; Sigma), kuglice sefaroze obavijene streptavidinom (GE Healthcare), nasumične heksamerne početnice (Applied Biosystems), octena kiselina (Kemika), PyroMark pufer za denaturaciju (Qiagen), PyroMark pufer za ispiranje (Qiagen), PyroMark pufer za prijanjanje (Qiagen), PyroMark pufer za vezanje (Qiagen), Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris; Sigma).

##### 3.1.2. Komercijalni kompleti

U ovom istraživanju je korišteno: EZ DNA Methylation-Gold™ Kit i EZ-96 DNA Methylation-Gold™ Kit za bisulfitnu konverziju (Zymo Research), PyroMark PCR Kit za umnažanje DNA PCR-om (Qiagen), PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents i PyroMark Gold Q24 Reagents za pirosekvenciranje (Qiagen).

##### 3.1.3. Enzimi, nukleotidi, nukleinske kiseline

U ovom istraživanju je korišteno: standard veličine odsječaka DNA za procjenu veličine uzoraka tijekom agarozne gel elektroforeze (100 bp DNA Ladder; Solis BioDyne), komercijalna kontrolna metilirana i nemetilirana DNA (EpiTect PCR Control DNA Set; Qiagen), Ex Taq polimeraza s pripadnim puferom (Takara), PrimeScript reverzna transkriptaza s pripadnim puferom (Takara), Recombinant RNazni inhibitor (Takara), smjesa dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Sigma).

Početnice korištene u reakciji lančane reakcije polimerazom i pirosekvenciranju su sintetizirane prema potrebi (Macrogen).

### 3.1.4. Potrošni laboratorijski materijal

U ovom istraživanju je korišteno: kadice za radnu stanicu za pirosekvenciranje (Qiagen), ljepljive folije za PCR pločice (ThermoFisher Scientific), pločice za PCR i pirosekvenciranje (Qiagen), pločice za RT-qPCR (engl. *96-well fast reaction plates*; Applied Biosystems), PSQ pločice za pirosekvenciranje (Qiagen), PyroMark Q24 nosač (engl. *cartridge*; Qiagen), samoljepiva prozirna optička folija za RT-qPCR (engl. *MicroAmp Optical Adhesive Film*; Applied Biosystems), strip poklopci za PCR pločice (Eppendorf).

### 3.1.5. Oprema

U ovom istraživanju je korišteno: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), centrifuga za PCR tubice (Eppendorf), centrifuga za pločice s 96 mjesta (Hettich), centrifuga za tubice od 1.5 mL (Eppendorf), grijača ploča (IKA), KODAK EDAS 290 (digitalni uređaj za snimanje gelova pod UV svjetlom; Kodak), NanoVue (GE Healthcare), PyroMark Q24 i PyroMark Q24 Advanced uređaj za pirosekvenciranje (Qiagen), PyroMark Q24 radna stanica za pirosekvenciranje sa sustavom za vakuum (Qiagen), stalak za grijaču ploču (Qiagen), sustav za elektroforezu (kalup za gel, češljici, kadice, izvor napona (engl. *power supply*); Biorad), tresilica za pločice za pirosekvenciranje (IKA), ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex), Veriti Thermal Cycler uređaj za PCR (Applied Biosystems).

### 3.1.6. Uzorci ispitanika

U prvom dijelu istraživanja, za analizu CpG metilacije korištena je DNA izolirana iz stanica pune krvi pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa te kontrolnih ispitanika (zdravih osoba). Uzorci su prikupljeni iz kliničkih centara Western General Hospital u Edinburghu te University Hospital Careggi u Firenzi koji su dio konzorcija projekta FP7 „*Diagnostic and prognostic biomarkers for inflammatory bowel disease (IBD-BIOM*, broj projekta: 305479)“. Za analizu CpG metilacije korištena je i DNA izolirana iz CD19+ B-limfocita iz krvi pacijenata te zdravih osoba koja je prikupljena u Edinburghu u sklopu istog projekta, ali se ne radi o istim osobama za koje je izolirana DNA iz pune krvi. Broj analiziranih uzoraka za svaki fragment gena *MGAT3* i *MGAT5* je prikazan u Tablici 1.

U drugom dijelu istraživanja, za analizu CpG metilacije se koristila DNA izolirana iz mononuklearnih stanica periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) te CD3+ T-limfocita izoliranih iz krvi i tkiva crijeva s mjesta upale pacijenata s ulceroznim

kolitisom kao i zdravih osoba, a za analizu ekspresije gena kandidata koristila se RNA izolirana iz CD3<sup>+</sup> T-limfocita iz krvi i tkiva crijeva pacijenata s ulceroznim kolitisom te zdravih osoba. Uzorci za ove analize su prikupljeni u okviru suradnje sa Zavodom za gastroenterologiju u Portu, Portugal (Gastroenterology department of Centro Hospitalar do Porto-Hospital de Santo António (CHP/HSA)). Broj analiziranih uzoraka za fragmente 1 i 2 za *MGAT3* te za fragment 7 za *MGAT5* je prikazan u Tablici 2.

Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Zagrebu odobrilo je ovo istraživanje.

Za potrebe optimizacije metode bisulfitne konverzije, lančane reakcije polimerazom i pirosekvenciranja, korištena je DNA izolirana iz staničnih linija HeLa (stanice karcinoma vrata maternice) i HepG2 (stanice hepatocelularnog karcinoma).

**Tablica 1. Broj uzoraka iz kohorti Edinburgh i Firenza u kojima je analizirana metilacija gena *MGAT3* i *MGAT5*.** HC- kontrolni ispitanici, UC- ulcerozni kolitis, CD- Crohnova bolest, PK- puna krv, BL- B-limfociti.

Gen	Fragment	Broj analiziranih uzoraka				Kohorta
		HC	UC	CD	ukupno	
MGAT3	1	66	165	71	302	Edinburgh (PK)
		147	99	161	407	Firenza (PK)
		29	17	19	65	Edinburgh (BL)
	2	73	148	65	286	Edinburgh (PK)
		134	130	107	371	Firenza (PK)
		29	18	20	67	Edinburgh (BL)
	3	10	17	7	34	Edinburgh (PK)
	4	60	78	16	154	Edinburgh (PK)
	5	25	37	16	78	Edinburgh (PK)
MGAT5	1	19	28	28	75	Edinburgh (PK)
	2	10	67	4	81	Edinburgh (PK)
	3	16	25	27	68	Edinburgh (PK)
	4	8	60	4	72	Edinburgh (PK)
	5	9	55	24	88	Edinburgh (PK)
	6	21	21	11	53	Edinburgh (PK)
	7	81	210	83	374	Edinburgh (PK)
		150	175	138	463	Firenza (PK)
		29	19	20	68	Edinburgh (BL)
ukupno		916	1369	821	3106	

**Tablica 2. Broj uzoraka iz kohorte Porto u kojoj je analizirana metilacija i ekspresija gena *MGAT3* i *MGAT5*.** HC- kontrolni ispitanici, UC- ulcerozni kolitis, PBMCs- mononuklearne stanice periferne krvi.

Gen	Fragment		Broj analiziranih uzoraka				
			DNA iz PBMCs	DNA iz T- limfocita iz krvi	DNA iz T- limfocita iz tkiva	RNA iz T- limfocita iz krvi	RNA iz T- limfocita iz tkiva
MGAT3	1	HC	9	11	10		
		UC	18	23	21		
	2	HC	10	11	10		
		UC	18	23	21		
MGAT5	7	HC	10	11	11	11	8
		UC	19	23	21	19	18
ukupno			84	102	94	30	26
			280			56	

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Metode za analizu metilacije DNA

#### 3.2.1.1. Bisulfitna konverzija

U svrhu analize stupnja metilacije, molekula DNA se tretira natrijevim bisulfitom pri čemu se svi nemetilirani citozini konvertiraju u uracil putem deaminacije, a metilirani citozini unutar CpG dinukleotida ostaju nepromijenjeni. Bisulfitna konverzija je provedena prema uputama proizvođača pri čemu je korišten komercijalan komplet kemikalija EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (DNA iz kohorti Portugal i B-limfociti) i EZ-96 DNA Methylation-Gold™ Kit (DNA iz kohorti Edinburgh i Firenza) te uređaj Veriti Thermal Cycler. Tretman natrijevim bisulfitom je proveden na 100 ng DNA izolirane iz PBMCs i T-limfocita iz kohorte Portugal te B-limfocita iz kohorte Edinburgh, odnosno na 500 ng DNA izolirane iz pune krvi iz kohorti Edinburgh i Firenza. 100 ng DNA je otopljeno u vodi u ukupnom volumenu od 50  $\mu$ L, a 500 ng DNA u 20  $\mu$ L. Smjesi DNA i vode je dodan CT Conversion Reagent nakon čega je slijedila denaturacija na 98°C 10 min. i inkubacija na 64°C 2.5 h. Dalje su slijedili koraci desulfonacije, ispiranja i eluiranja DNA. Bisulfitno konvertirana DNA je eluirana u 10 ili

15 µL pufera za eluciju, ovisno o korištenom komercijalnom kompletu, te je pohranjena na -20°C. Kao negativna kontrola bisulfitne konverzije korištena je voda umjesto DNA uzorka.

#### 3.2.1.2. Kreiranje početnica

Stupanj metilacije pojedinih CpG mjesta gena *MGAT3* i *MGAT5* je u ovom radu analiziran metodom pirosekvenciranja. Kako bi se DNA mogla analizirati ovom metodom, potrebno je umnožiti regiju koja sadrži željenu sekvencu i dobiti jednolančanu DNA koja će služiti kao kalup za pirosekvenciranje. U tu svrhu su kreirane početnice za lančanu reakciju polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) i pirosekvenciranje. Označene su slovima F (engl. *forward*) i R (engl. *reverse*) za PCR te Pyro (engl. *pyrosequencing*) za pirosekvenciranje (Tablica 3).

**Tablica 3. Početnice korištene za lančanu reakciju polimerazom i pirosekvenciranje fragmenata gena *MGAT3* i *MGAT5*. Različiti fragmenti unutar istog gena su nazvani rednim brojevima.**

Ime fragmenta	Ime početnice	Sekvenca početnice
MGAT3_1	MGAT3_F1	5'-GTTGGGATATAGAATAGGTAG-3'
	MGAT3_R1_Biot	5'-[Btn]ACCATTCTCTCAAACTCA-3'
	MGAT3_Pyro1	5'-GTTGGGATATAGAATAGGTAG-3'
MGAT3_2	MGAT3_F2	5'-GTTTTTGAGTTTTGAGAGGAATGG-3'
	MGAT3_R2_Biot	5'-[Btn]ACCCTCTTAAACCTACTCTCCTAC-3'
	MGAT3_Pyro2	5'-GTTTTTGAGTTTTGAGAGGAATGG-3'
MGAT3_3	MGAT3_F3	5'-AGTAGATATATAGATTTTGTAGA-3'
	MGAT3_R3_Biot	5'-[Btn]AATCTATACCTATATATACATAAAC-3'
	MGAT3_Pyro3	5'-AGTAGATATATAGATTTTGTAGA-3'
MGAT3_4	MGAT3_F4	5'-GTTGTTGAGATTAG-3'
	MGAT3_R4_Biot	5'-[Btn]CTAAAACTCTACCCTCC-3'
	MGAT3_Pyro4	5'-GGTGAGTTGATTT-3'
MGAT3_5	MGAT3_F5	5'-GGGTTGGGGTGGGAGGTTTT-3'
	MGAT3_R5_Biot	5'-[Btn]CCCTCTCCACATTTACCTCTACCT-3'
	MGAT3_Pyro5	5'-GGGTTGGGGTGGGAGGTTTT-3'
MGAT5_1	MGAT5_F1	5'-TGTATATTGTTTTGATTTTGTAGGA-3'
	MGAT5_R1_Biot	5'-[Btn]TTCTCCCAACCACTCTATTCC-3'
	MGAT5_Pyro1	5'-TGTATATTGTTTTGATTTTGTAGGA-3'
MGAT5_2	MGAT5_F2	5'-GGAAGGTTGTTAGAAATTGAGGA-3'
	MGAT5_R2_Biot	5'-[Btn]ATCTACAAACTACCAACCCTAAC-3'
	MGAT5_Pyro2	5'-GGAAGGTTGTTAGAAATTGAGGA-3'
MGAT5_3	MGAT5_F3	5'-GTTGGTAGTTTGTAGA-3'
	MGAT5_R3_Biot	5'-[Btn]ACTACCTAAACTAAATC-3'
	MGAT5_Pyro3	5'-GTTGGTAGTTTGTAGA-3'
MGAT5_4	MGAT5_F4	5'-GATTTAGTTTAGGTAGT-3'
	MGAT5_R4_Biot	5'-[Btn]CTCTTACCTCCTTATTA-3'
	MGAT5_Pyro4	5'-GATTTAGTTTAGGTAGT-3'
MGAT5_5	MGAT5_F5	5'-GGAAGGAAGAAGGAGGGA-3'
	MGAT5_R5_Biot	5'-[Btn]CTCCCTACAACCTCCCAAA-3'
	MGAT5_Pyro5	5'-GGAAGGAAGAAGGAGGGA-3'
MGAT5_6	MGAT5_F6	5'-GGGTGGTTAGAGGTTTGGAG-3'
	MGAT5_R6_Biot	5'-[Btn]CCCTTACACCCTACCTACTC-3'
	MGAT5_Pyro6	5'-GGGTGGTTAGAGGTTTGGAG-3'
MGAT5_7	MGAT5_F7	5'-GAGTTAGGTGTAGTATTTAGT-3'
	MGAT5_R7_Biot	5'-[Btn]CCTCTTTCCTTCCTCCAC-3'
	MGAT5_Pyro7	5'-TGTTTAGTTATTAGGGTTTGA-3'

Sekvenca gena *MGAT3* je pronađena pomoću genomskog preglednika internet stranice UCSC (University of California, Santa Cruz). Korištena je baza podataka RefSeq (National Center for Biotechnology Information, NCBI) u kojoj je odabrana sekvenca gena iz verzije genoma čovjeka hg19 koja je objavljena u veljači 2009. godine. Sekvenca gena *MGAT5* je pronađena pomoću genomskog preglednika internet stranice Ensembl. Odabrana je sekvenca gena iz verzije genoma čovjeka hg38 koja je objavljena u prosincu 2013. godine. Identifikacijska oznaka sekvence za *MGAT3* je 4248, a za *MGAT5* 4249. Sekvenca promotora gena i CpG otoka je pronađena preko UCSC-a za *MGAT3* te preko Ensembl-a i NCBI-a za *MGAT5*.

Početnice *MGAT5\_F1*, *MGAT5\_R1\_Biot* i *MGAT5\_Pyro7* su kreirane uz pomoć programa PyroMark Assay Design (Qiagen), dok su ostale početnice kreirane ručno. Početnice za PCR su kreirane na način da se vežu za slijed DNA koji sadrži barem tri citozina koji konverzijom prelaze u uracil, i kasnije se zamjenjuju timinom tijekom PCR-a, kako bi takve početnice bile specifične za bisulfitno konvertiranu DNA. Slijed DNA za koji se vežu početnice nije sadržavao citozine koji prethode gvaninima s obzirom da je prije analize metilacijski status takvih citozina nepoznat pa se na tim mjestima nakon bisulfitne konverzije može nalaziti citozin ili timin. Time se smanjuje nespecifičnost vezanja početnica. Prilikom osmišljavanja početnica, vodilo se računa da su temperatura taljenja (engl. *melting temperature*,  $T_m$ ) i duljina početnica F i R što sličnije. Kako bi se omogućila veća specifičnost vezanja početnica i efikasnije umnažanje, početnice su imale duljinu 20-27 pb, a  $T_m$  je iznosila 55-65°C, osim u slučajevima kada to nije bilo moguće zbog sastava sekvence. Kako bi se tijekom pirosekvenciranja mogla dobiti jednolančana DNA koja će služiti kao kalup za reakciju, jedan od lanaca mora biti biotiniliran pa su R primeri za PCR bili obilježeni biotinom na 5' kraju. Kao početnice za pirosekvenciranje su korištene F početnice za PCR ili je odabrana druga sekvenca koja je komplementarna biotiniliranom lancu PCR produkta. Niti ove početnice nisu sadržavale citozine koji su dio CpG dinukleotida, a sadržavale su citozine nakon kojih ne slijedi gvanin kako bi bile specifične za konvertiranu DNA.

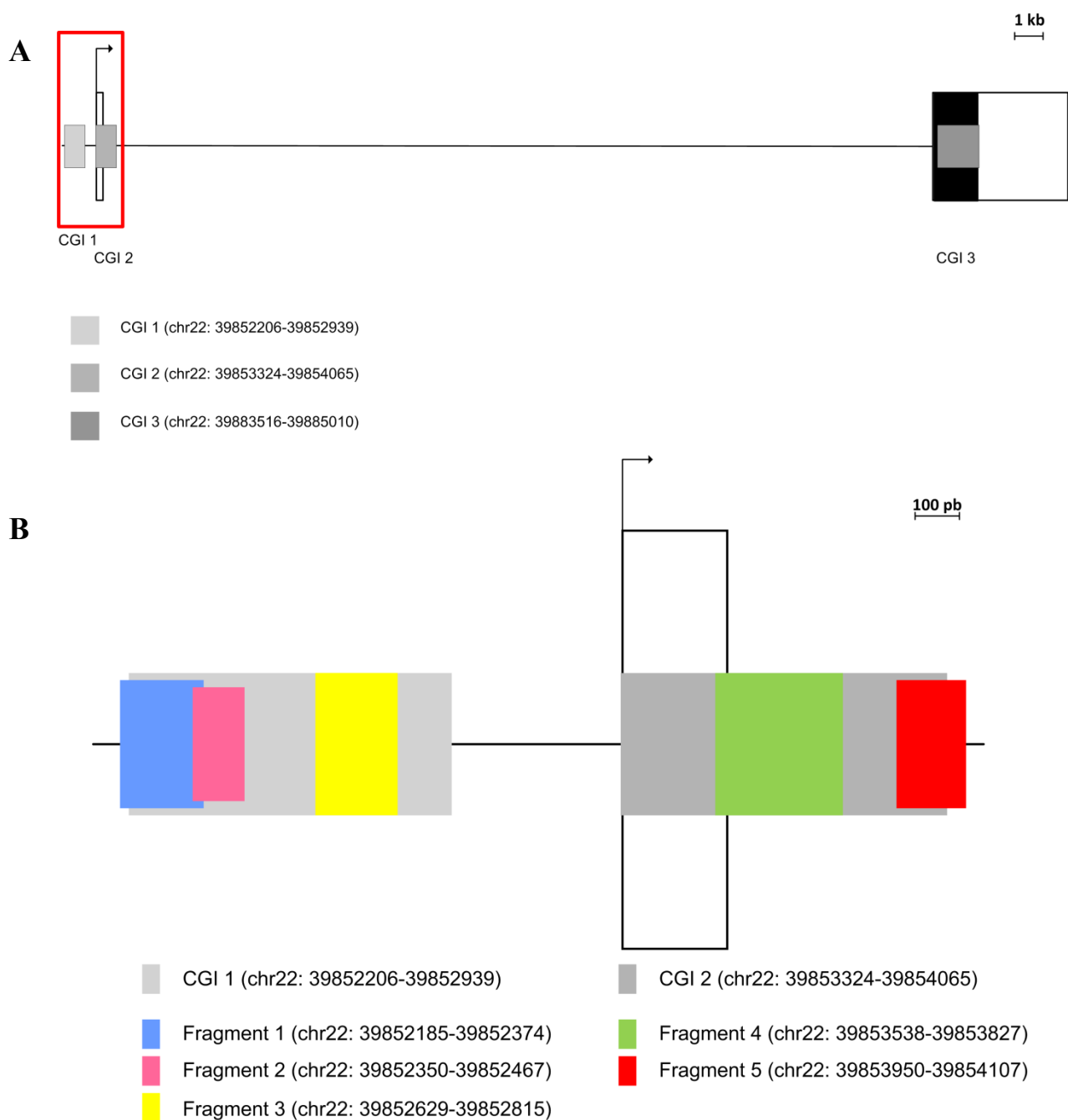
S obzirom da se metodom pirosekvenciranja može analizirati samo ograničena duljina fragmenata DNA, kreirano je više setova početnica koje umnažaju različite fragmente unutar gena kako bi se analizirao što veći broj CpG mjesta. Analizirano je ukupno 32 CpG mjesta unutar gena *MGAT3* te 65 CpG mjesta unutar gena *MGAT5* (Tablica 4).

**Tablica 4. Fragmenti gena *MGAT3* i *MGAT5* u kojima je analizirana CpG metilacija**

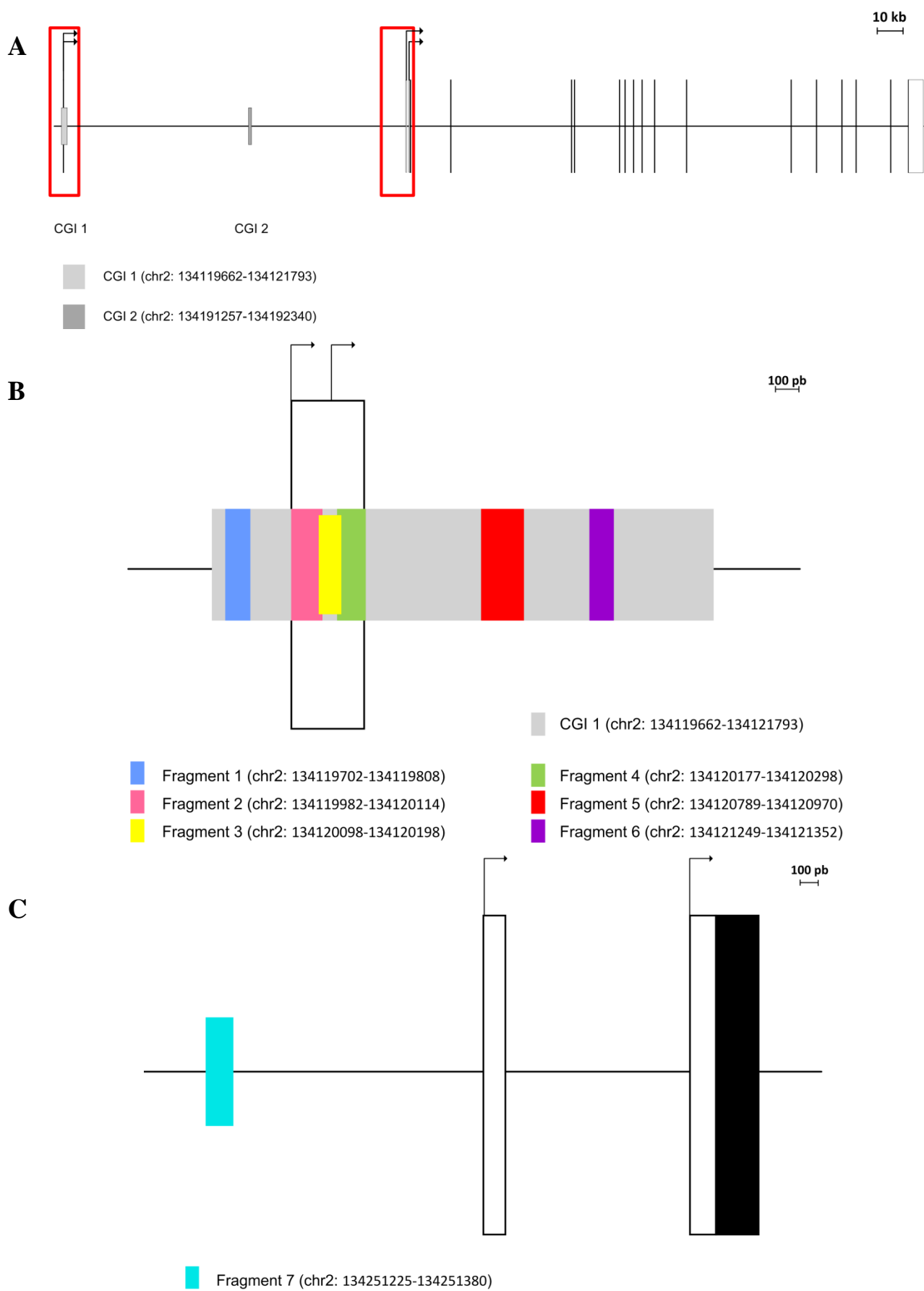
Ime fragmenta	Položaj	Veličina (pb)	Broj analiziranih CpG mjesta
MGAT3_1	Promotor	190	10
MGAT3_2	Promotor	118	5
MGAT3_3	Promotor	187	3
MGAT3_4	Prvi intron	290	5
MGAT3_5	Prvi intron	158	9
MGAT5_1	Promotor	107	5
MGAT5_2	Prvi ekson	133	13
MGAT5_3	Prvi ekson	96	15
MGAT5_4	Prvi ekson	122	17
MGAT5_5	Prvi intron	182	5
MGAT5_6	Prvi intron	104	6
MGAT5_7	Prvi intron	156	4

Fragmenti 2, 3 i 4 gena *MGAT3* se nalaze cijelom dužinom sekvence unutar CpG otoka, a sekvenca fragmenata 1 i 5 se većinski nalazi unutar CpG otoka. Fragmenti 1, 2, i 3 se nalaze unutar promotora gena u prvom CpG otoku, a fragmenti 4 i 5 se nalaze u drugom CpG otoku s time da je fragment 5 cijelom dužinom sekvence unutar prvog introna, a sekvenca fragmenta 4 se većinski nalazi unutar prvog introna (Slika 7). Svi fragmenti gena *MGAT5*, osim fragmenta 7 se nalaze unutar prvog CpG otoka. Fragment 1 se nalazi unutar promotora gena, fragmenti 2, 3, i 4 unutar prvog eksona, a fragmenti 5, 6 i 7 unutar prvog introna gena (Slika 8).





**Slika 7. A) Shematski prikaz gena *MGAT3*.** CpG otoci su označeni sivom bojom (CGI od engl. *CpG island*) te su prikazane koordinate CpG otoka. Pravokutnici predstavljaju eksone (crno ispunjeni su kodirajući eksoni, a neispunjeni su nekodirajući eksoni), horizontalna linija između eksona predstavlja introne, a horizontalna linija uzvodno od prvog eksona označava promotor gena. Strelica označava mjesto početka transkripcije. Crveno obojani pravokutnik označava dio sheme uvećano prikazan na slici B. **B) Shematski prikaz položaja fragmenata unutar kojih je analizirana CpG metilacija.** Svakom fragmentu su pridruženi pripadajuća boja i koordinate unutar gena.



**Slika 8.** Opis slike na sljedećoj stranici.

**Slika 8. A) Shematski prikaz gena *MGAT5*.** CpG otoci su označeni sivom bojom (CGI od engl. *CpG island*) te su prikazane koordinate CpG otoka. Eksoni su označeni kao pravokutnici ili vertikalne linije, ovisno o veličini eksona. Crno ispunjeni su kodirajući eksoni (dio eksona 2, ekson 3-17, dio eksona 18), a neispunjeni su nekodirajući eksoni (ekson 1 i 2, dio eksona 3 i 18). Horizontalna linija između eksona predstavlja introne, a horizontalna linija uzvodno od prvog eksona označava promotor gena. Strelica označava mjesto početka transkripcije. Crveno obojani pravokutnici označavaju dijelove sheme uvećano prikazane na slici B i C. **B) Shematski prikaz položaja fragmenata unutar kojih je analizirana CpG metilacija.** Fragmenti se nalaze unutar CGI 1, svakom fragmentu su pridruženi pripadajuća boja i koordinate unutar gena. **C) Shematski prikaz položaja fragmenta unutar kojeg je analizirana CpG metilacija.** Fragment se nalazi unutar prvog introna gena, označen je bojom te su mu pridružene koordinate unutar gena.

Odabir analiziranih CpG mjesta unutar CpG otoka bio je nasumičan za fragmente 2, 3, 4 i 5 gena *MGAT3*, te fragmente 1, 2, 3, 4, 5, i 6 gena *MGAT5*. CpG mjesta unutar fragmenta 1 gena *MGAT3* i fragmenta 7 gena *MGAT5* su odabrana na temelju podataka iz baze GEO (Gene Expression Omnibus, NCBI). Ova baza podataka sadrži podatke metilacije DNA iz periferne krvi i sluznice crijeva zdravih osoba te osoba koje boluju od UC-a i CD-a. Podaci su dobiveni pomoću tehnologije Illumina HumanMethylation450 BeadChip v1.1 i prikazani kao beta vrijednosti koristeći omjer intenziteta metiliranog lokusa i sume intenziteta metiliranog i nemetiliranog lokusa. Odabrana su ona CpG mjesta za koja postoji velika razlika u vrijednostima između UC/CD i HC u odnosu na ostala analizirana CpG mjesta. Identifikacijska oznaka takvih mjesta je cg00820535 za fragment 1 gena *MGAT3* i cg08251036 za fragment 7 gena *MGAT5*. Osim navedenih CpG mjesta, fragment 1 *MGAT3* sadrži dodatnih 9 CpG mjesta, a fragment 7 *MGAT5* dodatna 3 CpG mjesta.

### 3.2.1.3. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom nakon bisulfitne konverzije je korištena za umnažanje specifične regije unutar gena *MGAT3* i *MGAT5*. Tijekom PCR-a se uracili, nastali konverzijom nemetiliranih citozina, zamjenjuju timinom. U tu svrhu je korišten komercijalan komplet kemikalija prilagođen bisulfitnom pirosekvenciranju (PyroMark PCR Kit) prema uputama proizvođača. Za fragment 4 gena *MGAT3* je prethodno optimizirana svaka komponenta reakcijske smjese, a za sve ostale fragmente gena *MGAT3* i *MGAT5* je optimizirana koncentracija početnica i DNA. Korištene su početnice specifične za bisulfitno konvertiranu DNA od kojih je jedna bila obilježena biotinom na 5' kraju. Sinteza početnica je

naručena od tvrtke *Macrogen*. Početnice su kratko centrifugirane u liofiliziranom obliku, otopljene u AccuGENE H<sub>2</sub>O do koncentracije od 100 µM i pohranjene na -20°C. Početnice korištene za gene *MGAT3* i *MGAT5* su prikazane u Tablici 3. Reakcijska smjesa za PCR sadržavala je vodu, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad i početnice. Za fragment 4 gena *MGAT3* je korišteno 16 µL vode, 25 µL PyroMark PCR Master Mix-a, 5 µL CoralLoad-a te početnice (c= 0.2 µM). Za sve ostale fragmente gena *MGAT3* i *MGAT5*, korišteni su dva puta manji volumeni komponenti reakcijske smjese u odnosu na fragment 4 gen *MGAT3*. U smjesu je dodano 2 µL bisulfitno konvertirane DNA uzoraka za fragment 4 gena *MGAT3*, a za sve ostale fragmente gena *MGAT3* i *MGAT5* je dodan 1 µL. Osim DNA uzoraka, u istom volumenu je korišten i EpiTect PCR Control DNA Set koji sadrži bisulfitno konvertiranu metiliranu i nemetiliranu DNA koje su služile kao kontrola za PCR i pirosekvenciranje. Kao negativna kontrola PCR reakcije korištena je voda koja je dodana u reakcijsku smjesu umjesto DNA uzorka. Korištena je i negativna kontrola iz koraka bisulfitne konverzije.

Za svaki fragment prethodno je optimizirana temperatura vezanja početnica i broj ciklusa. Program PCR reakcije se odvijao u uređaju Veriti Thermal Cycler, a uključivao je aktivaciju HotStarTaq DNA polimeraze u trajanju od 15 min. na 95°C nakon čega je slijedilo 50 ciklusa denaturacije od 30 s na 95°C, vezanja početnica od 30 s na temperaturi specifičnoj za svaki fragment (Tablica 5) i produljivanja od 30 s na 72°C te kao zadnji korak završna elongacija od 10 min. na 72°C. Produkti lančane reakcije polimerazom su provjereni elektroforezom u 2% agaroznom gelu te pohranjeni na -20°C do korištenja.

**Tablica 5. Temperature vezanja početnica korištenih u reakciji PCR**

Ime fragmenta	Temperatura vezanja početnica (°C)
MGAT3_1	54 (za DNA iz B-limfocita 55°C)
MGAT3_2	60
MGAT3_3	47
MGAT3_4	51
MGAT3_5	60
MGAT5_1	56
MGAT5_2	56
MGAT5_3	47
MGAT5_4	40
MGAT5_5	58
MGAT5_6	60
MGAT5_7	55

#### 3.2.1.4. Agarozna gel elektroforeza

Agarozni gelovi za elektroforezu (2% (w/v)) su pripremljeni otapanjem 2 g agaroze u 100 mL pufera 1x TAE ( $c(\text{Tris}) = 40 \text{ mM}$ ,  $c(\text{EDTA}) = 1 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 8.0$ ) grijanjem u mikrovalnoj pećnici dok agaroz nije bila u potpunosti otopljena. U gel je dodano 5  $\mu\text{L}$  etidijevog bromida (10 mg/mL). Kao standard veličine odsječaka DNA tijekom elektroforeze je korišten 100 bp DNA Ladder te ga je nanoseno na gel 5  $\mu\text{L}$  kao i uzoraka. Elektroforeza se odvijala u puferu 1x TAE na 80 V u trajanju od 45 min. Gel je fotografiran u digitalnom uređaju za snimanje gelova pod UV svjetlom KODAK EDAS 290. Slike su obrađene u pripadajućem računalnom programu Kodak 1D.

Ukoliko je DNA uzoraka bila umnožena u dovoljnoj količini te nije bilo prisutnih kontaminanata u PCR reakcijskoj smjesi, PCR produkti su analizirani metodom pirosekvenciranja.

#### 3.2.1.5. Pirosekvenciranje

Za kvantitativno određivanje stupnja metilacije DNA korištena je metoda pirosekvenciranja. U tu svrhu je korišten uređaj PyroMark Q24 za fragment 4 gena *MGAT3* i PyroMark Q24 Advanced za sve ostale fragmente gena *MGAT3* i *MGAT5*. Priprema uzoraka za pirosekvenciranje je provedena prema uputama proizvođača koristeći PyroMark Gold Q24 reagens za fragment 4 gena *MGAT3* i PyroMark Q24 Advanced CpG reagens za sve ostale fragmente gena *MGAT3* i *MGAT5*, a uključivala je vezanje umnoženih biotiniliranih sekvenci DNA za kuglice sefaroze obavijene streptavidinom, denaturaciju te vezanje početnica za DNA. Sekvence korištenih početnica u reakcijskoj smjesi za pirosekvenciranje su prikazane u Tablici 3. Sastav reakcijskih smjesa za pirosekvenciranje za analizu gena *MGAT3* i *MGAT5* je prikazan u Tablici 6. Prije stavljanja u uređaj, reakcijska smjesa je zagrijavana na 80°C 2 min. Za svaki fragment gena *MGAT3* i *MGAT5* je prethodno optimiziran volumen pufera za vezanje, sefaroze i DNA produkta te je optimizirano vrijeme zagrijavanje smjese DNA i početnica na 80°C (osim za fragment 4 gena *MGAT3*). Za fragment 4 gena *MGAT3* je optimiziran i volumen početnica i pufera za prijanjanje.

Za pripremu metilacijskih testova (1-5 gena *MGAT3* i 1-7 gena *MGAT5*) te predložka reakcije korišten je program PyroMark u kojem se definirala sekvenca za analizu, redoslijed dodavanja nukleotida u reakciju (engl. *dispensation order*, DO) te položaj uzoraka na

reakcijskoj ploči. Na temelju upisanih podataka, program je izračunao potrebne volumene za enzime, supstrate i nukleotide koji su potom dodani u nosač (engl. *cartridge*) prema uputama proizvođača. Nosač se zatim postavio u uređaj. U Tablici 7 su prikazane sekvence koje su analizirane za gene *MGAT3* i *MGAT5* te pripadajući DO koji je određen ručno za fragment 4 gena *MGAT3* te pomoću programa PyroMark za sve ostale fragmente gena *MGAT3* i *MGAT5*. Svaki DO sadrži kontrolu bisulfitne konverzije.

Kao kontrola pirosekvenciranja, korištena je kontrolna DNA EpiTect PCR Control DNA Set umnožena PCR-om. Kao negativna kontrola korištena je voda AccuGENE umjesto PCR produkta u reakcijskoj smjesi za pirosekvenciranje. Korištena je i negativna kontrola PCR reakcije. Po završetku postupka, podaci su se analizirali u programu PyroMark prema zadanim parametrima analize.

**Tablica 6. Sastav reakcijskih smjesa za pirosekvenciranje.** Volumeni su prikazani za jedan uzorak, osim volumena 70% EtOH, pufera za denaturaciju, pufera za ispiranje te dH<sub>2</sub>O koji su dani za 24 uzorka.

Reagensi	Volumen		
	MGAT3_1, 2, 3, 5, MGAT5_1, 2, 5, 6, 7	MGAT3_4	MGAT5_3, 4
Kuglice sefaroze	3 µL	3 µL	1 µL
Pufer za vezanje	37 µL	37 µL	40 µL
AccuGENE dH <sub>2</sub> O	20 µL	0	19 µL
PCR produkt	20 µL	40 µL	20 µL
Počelnica za pirosekvenciranje	0.75 µL (0.375 µM)	0.16 µL (0.4 µM)	0.75 µL (0.375 µM)
Pufer za prijanjanje	19.25 µL	40 µL	19.25 µL
70% EtOH	40 mL		
Pufer za denaturaciju	40 mL		
1 x pufer za ispiranje	50 mL		
MilliQ dH <sub>2</sub> O	120 mL		

**Tablica 7. Prikaz analiziranih sekvenci gena *MGAT3* i *MGAT5* nakon bisulftine konverzije te pripadajući redoslijed dodavanja nukleotida u reakciju (engl. *dispensation order*, DO). Y=C/T.**

Fragment		
MGAT3_ 1	sekvenca	YGTATTTTGTATTTTYGAYGATGGYGGYGTAGAGATGTTTGTGTYGTATTATAATGTTTT GTGTTTYGTATYGYGGGAGGAAGTGTTGTTTGTAGGTTTTAGAAAYGGAA
	DO	ATCGCTATTGTGATTCTGTATCGATAGTCAGTCGTAGAGATGTGTAGTCGTATATATGTTGT AGTTCTGTGATCTAGTCGAGAGTGTGTTGTAGTTAGTATCG
MGAT3_ 2	sekvenca	TTTAGAGTAAGGTTAYGAGGAGTTAGGTTAYGATAYGGTGGGTTTTYGGAGAATYGTG
	DO	ATAGAGCTAGTGATCGAGAGTAGTGATCGATGATCGTAGTTCTGAGTATCTGT
MGAT3_ 3	sekvenca	TATYGTAATAGGTTYGGTATYGTG
	DO	ACTGATCTGTATATGTCTGTGATCTGT
MGAT3_ 4	sekvenca	YGGYGTTTTGGGGGGYGYGYGGT
	DO	GTCTGTCGTCTGGTCTGTCGTCGC
MGAT3_ 5	sekvenca	YGYGTTYGTTTTTTTTATTTTYGATTTTAGATTGYGGYGGYGGTAGTYGAGGTTTAAGYGTA
	DO	GTCAGTCAGTCTGTTGATTCTGATTAGACTAGTCAGTCAGTCGTATGTCTGAGTATGTCGT
MGAT5_ 1	sekvenca	TATTATTTATGGTYGYGATTAGAAGGTTYGTTYGTTTTTTTTTTTTTTTTGGGTTGYG
	DO	GTATATATAGTCTAGTCGATCAGATGTTCTAGTCTGTTGTAGTC
MGAT5_ 2	sekvenca	YGGATTTYGTTTTGGTYGATTGAGTTTTTATAGGAGYTTTTTGTGTYGTTYGGGGTTGA GTGTGGAYGYGTYGYGYGGTTTYG
	DO	GTCGTATTCTGTTAGTCGATGAGTTACTAGATGTCGTTGTAGTCAGTTCTGGTGAGTGTGTA TCAGTCAGTCTAGTCAGTCAGTCAGTTCT
MGAT5_ 3	sekvenca	TYGTTTTGTGYGGTTYGTTYGGYGGYGGTTTTGYGGTTTTYGYGGYGGYGGTTYGGGY GYG
	DO	GTCTGTTAGTCTAGTCAGTCTAGTCTAGTCAGTCGTCTAGTCAGTTCTAGTCAGTCAGTCAG TTCTAGTCAGTC
MGAT5_ 4	sekvenca	YGYGTYGTAGGTTYGGGGYGYGYGATTTYGYGTTYGGGTYGYGTGGGTAYGGYGGTYG GYGGGTGTTTTY
	DO	GTCAGTCAGTCTGCTATGTCTGGTCAGTCAGTCGTATTCTAGTCAGTTCTAGTCTAGTCGTG TGATCAGTCAGTCTAGTCGTAGTTCT
MGAT5_ 5	sekvenca	GGTTGGTTTTYAGTTTTTAGGGAGGAGGGATGYGGYGGGTTGGYGTTTTY
	DO	TGCTAGTTCTGAGTTAGAGAGATAGTCAGTCGTAGTCAGTTCT
MGAT5_ 6	sekvenca	YGYGGTTTTAGTTTGGTGGATTYGYGYGYG
	DO	GTCAGTCGCTTAGTGTGTATCTAGTCAGTCAGTCG
MGAT5_ 7	sekvenca	TGGTYGTTTATGTTTAATATAGATTGGYGYGGAGYG
	DO	GTAGTCTGTATGTATATAGACTAGTCAGTCGATGTC

### 3.2.2. Metode za analizu ekspresije gena

#### 3.2.2.1. Reverzna transkripcija

Reverznom transkripcijom se izolirana RNA prepisuje u cDNA kako bi se mogla umnožiti metodom RT-qPCR. U tu svrhu se najprije pripremila reakcijska smjesa koja je sadržavala 100 ng RNA, nasumične heksamerne početnice ( $c = 5 \mu\text{M}$ ), dNTP-ove ( $c = 1 \text{ mM}$  svaki) te vodu AccuGENE u ukupnom volumenu od  $10 \mu\text{L}$ . Reakcijska smjesa je zagrijavana na  $65^\circ\text{C}$  5 min. te ohlađena na ledu najmanje 5 min. Nakon toga je pripremljena druga reakcijska smjesa koja je sadržavala PrimeScript reverznu transkriptazu ( $c = 5 \text{ U}/\mu\text{L}$ ), Recombinant RNazni inhibitor ( $c = 1 \text{ U}/\mu\text{L}$ ), 5x PrimeScript pufer (1x) te vodu AccuGENE u ukupnom volumenu od  $10 \mu\text{L}$ . Kao negativna kontrola je pripremljena reakcijska smjesa bez RNA. Napravljena je i reverzna transkripcija za RNA iz stanične linije BG1 (stanice karcinoma jajnika) koja je služila kao pozitivna kontrola za RT-qPCR. Dvije pripremljene reakcijske smjese su se pomiješale te se reakcija odvijala u uređaju Veriti Thermal Cycler s programom od 60 min. na  $42^\circ\text{C}$  i 15 min. na  $70^\circ\text{C}$ . cDNA je pohranjena na  $-20^\circ\text{C}$  do daljnje analize.

#### 3.2.2.2. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Za analizu ekspresije gena *MGAT5* korištena je metoda kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu (engl. *quantitative real time polymerase chain reaction*, RT-qPCR) pomoću specifičnih hidrolizirajućih proba, tzv. TaqMan proba. Metoda se temelji na vezanju početnica i probe specifične za ciljanu molekulu cDNA, umnožavanju željene regije u velikom broju kopija te detekciji i kvantifikaciji fluorescencije u stvarnom vremenu čiji signal raste u izravnoj ovisnosti o broju kopija novosintetiziranih molekula. Za pripremu reakcijske smjese je prema uputama proizvođača korišten 2x TaqMan Gene Expression Master Mix (1x) te 20x TaqMan Gene Expression Assay (1x) koji omogućuju umnažanje cDNA za *MGAT5* te endogenu kontrolu *HMBS*. Korišteni su sljedeći TaqMan Gene Expression Assay-i: *MGAT5*-Hs00159136\_m1, *HMBS*-Hs00609297\_m1. U reakcijsku smjesu je dodana voda oslobođena od RNaza do ukupnog volumena od  $19 \mu\text{L}$ . U svaku jažicu na reakcijskoj ploči (*96-well fast* pločice za RT-qPCR) je ispipetirana reakcijska smjesa te  $1 \mu\text{L}$  cDNA. Za sve analizirane gene su rađeni triplikati. Korištena je i negativna kontrola bez cDNA te negativna kontrola iz koraka reverzne transkripcije. Kao pozitivna kontrola je korištena cDNA iz stanične linije BG1. Reakcijska ploča se zatim pokrila samoljepivom prozirnom optičkom folijom (engl. *MicroAmp Optical Adhesive Film*) te postavila u instrument 7500 Fast Real-Time PCR



System. Prije pokretanja reakcije je u programu 7500 Software v2.0.6. napravljen tablični prikaz položaja uzoraka na reakcijskoj ploči, definirana je metoda (Quantitation- Comparative Ct), reagensi (TaqMan) te brzina reakcije (standardna). Reakcija se odvijala najprije na 50°C 2 min., zatim na 95°C 10 min. te 40 ciklusa na 95°C 15 s i na 60°C 1 min.

### 3.2.3. Analiza podataka i statistička obrada

#### 3.2.3.1. CpG metilacija

Podaci CpG metilacije su prikazani kao aritmetička sredina analiziranih CpG mjesta unutar istovjetne skupine (HC, UC ili CD) za gene *MGAT3* i *MGAT5*. Odstupanje od aritmetičke sredine je izraženo u obliku standardne devijacije. Grafički prikaz rezultata CpG metilacije je napravljen u programu GraphPad Prism 7. Statistička obrada dobivenih podataka je napravljena pomoću računalnog programa Statistica 13 (StatSoft Inc.). Za analizu CpG metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* u upalnim bolestim crijeva korišten je neparametrijski test Mann-Whitney U test pri čemu je uspoređena metilacija svakog CpG mjesta gena *MGAT3* i *MGAT5* između dviju nezavisnih skupina: kontrolnih ispitanika u odnosu na pacijente koji boluju od Crohnove bolesti ili ulceroznog kolitisa, te između skupina pacijenata međusobno. Statistički značajne vrijednosti su one koje su se razlikovale na razini  $p < 0.05$  pri čemu je napravljena Bonferronijeva korekcija. Vrijednost  $p$  je korigirana za broj provedenih testova, odnosno broj analiziranih CpG mjesta. Bonferronijeva korekcija nije primjenjena jedino na rezultatima kohorte iz Porta zbog malog broja uzoraka uključenih u analizu.

#### 3.2.3.2. Ekspresija gena

Relativna razina ekspresije gena *MGAT5* izračunata je komparativnom  $C_t$  metodom, koja je izražena formulom  $2^{-(\Delta C_t)}$ , gdje je  $\Delta C_t = \overline{C_t}$  (gena kandidata) -  $\overline{C_t}$  (endogene kontrole *HMBS*), a  $\overline{C_t}$  je srednja vrijednost replika (Schmittgen i Livak, 2008.). Za izradu grafičkog prikaza rezultata ekspresije gena *MGAT3* i *MGAT5*, korišten je program GraphPad Prism 7. Statistička obrada dobivenih podataka je napravljena pomoću računalnog programa Statistica 13 (StatSoft Inc.). Neparametrijski test Mann-Whitney U test korišten je za sve usporedbe rezultata. Uspoređena je: 1) ekspresija gena *MGAT5* u T-limfocitima iz krvi pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (UC) u odnosu na kontrolne ispitanike (HC); 2) ekspresija gena *MGAT5* u T-limfocitima iz tkiva s mjesta upale za UC u odnosu na HC; 3) ekspresija gena *MGAT5* u T-limfocitima iz krvi za inaktivni UC u odnosu na aktivni UC; 4) ekspresija gena

*MGAT5* u T-limfocitima iz tkiva s mjesta upale za inaktivni UC u odnosu na aktivni UC. Statistički značajne vrijednosti su one koje su se razlikovale na razini  $p < 0.05$ .

#### 3.2.4. Korelacijske analize

Korelacijske analize metilacije DNA i glikozilacije IgG-a su uključivale podatke metilacije dobivene iz uzoraka pune krvi te podatke glikozilacije IgG-a dobivene iz plazme istih pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa te kontrolnih ispitanika. Svakom uzorku je izračunata srednja vrijednost metilacije svih analiziranih CpG mjesta fragmenata 1 i 2 gena *MGAT3* za kohorte uzoraka iz Edinburgha i Firenze. Rezultati *N*-glikozilacije IgG-a analizirani su u suradnji s Laboratorijem za glikobiologiju tvrtke Genos d.o.o. u Zagrebu. *N*-glikani IgG-a iz kohorte Edinburgh su analizirani pomoću metode UPLC, a *N*-glikani IgG-a iz kohorte Firenza pomoću metode LC-MS. Ovim metodama se kao rezultat dobije kromatogram pri čemu je udio površine koji zauzima pojedini kromatografski pik (u kojem eluiraju pojedine slične glikanske strukture) izražen kao postotak ukupne površine kromatograma.

Kako bi rezultati glikozilacije IgG-a iz ove dvije kohorte bili usporedivi, za korelacijsku analizu su uzete u obzir samo one strukture koje su identificirane u obje kohorte. Takvih struktura je 13. Osim glikanskih struktura, za korelaciju su uzeti u obzir i derivirani parametri koji predstavljaju udio svih struktura glikana sličnih strukturnih obilježja u ukupnom glikomu IgG-a, kao što je postotak struktura koje sadrže rasijecajući *N*-acetilglukozamin. Izračunati su i omjeri FA2B/FA2, FA2BG1/FA2G1 i FA2BG2/FA2G2 te korelirani s metilacijom *MGAT3*. Struktura A2 predstavlja srž glikana koja se sastoji od dva *N*-acetilglukozamina i tri manoze na koju su vezana dva dodatna *N*-acetilglukozamina. B predstavlja rasijecajući *N*-acetilglukozamin, F predstavlja sržnu fukozu, a G predstavlja galaktozu pri čemu brojka uz G označava broj galaktoza.

Rezultatima CpG metilacije su pridruženi odgovarajući rezultati glikozilacije IgG-a istog uzorka. Korelacijska analiza je napravljena između podataka srednjih vrijednosti metilacije i 17 glikanskih svojstava (13 glikanskih struktura i četiri derivirana parametra) koristeći Pearsonov koeficijent korelacije. Razina značajnosti je korigirana prema Bonferronijevoj korekciji za 17 glikanskih svojstava te postavljena na  $p < 0.003$ . Korelacijske

analize stupnjeva CpG metilacije i glikanskih struktura na molekulama IgG-a napravljene su u programskom paketu R.

Korelacijska analiza podataka CpG metilacije iz krvi i glikozilacije IgG-a iz plazme istih pacijenata nije napravljena za gen *MGAT5*. Gen *MGAT5* kodira za enzim GnT-V koji prenosi N-acetilglukozamin na  $\beta$ 1,6-vezanu manozu u srži od tri manoze *N*-glikana pri čemu nastaje razgranata struktura *N*-glikana. Analizom glikoma IgG-a nisu dobivene razgranate strukture za koje je odgovoran GnT-V (Trbojević Akmačić i sur., 2015.) što ukazuje da ovaj enzim ne glikozilira molekulu IgG-a. Iz tog razloga nije napravljena korelacijska analiza podataka metilacije gena *MGAT5* s podacima glikozilacije IgG-a.

## 4. REZULTATI

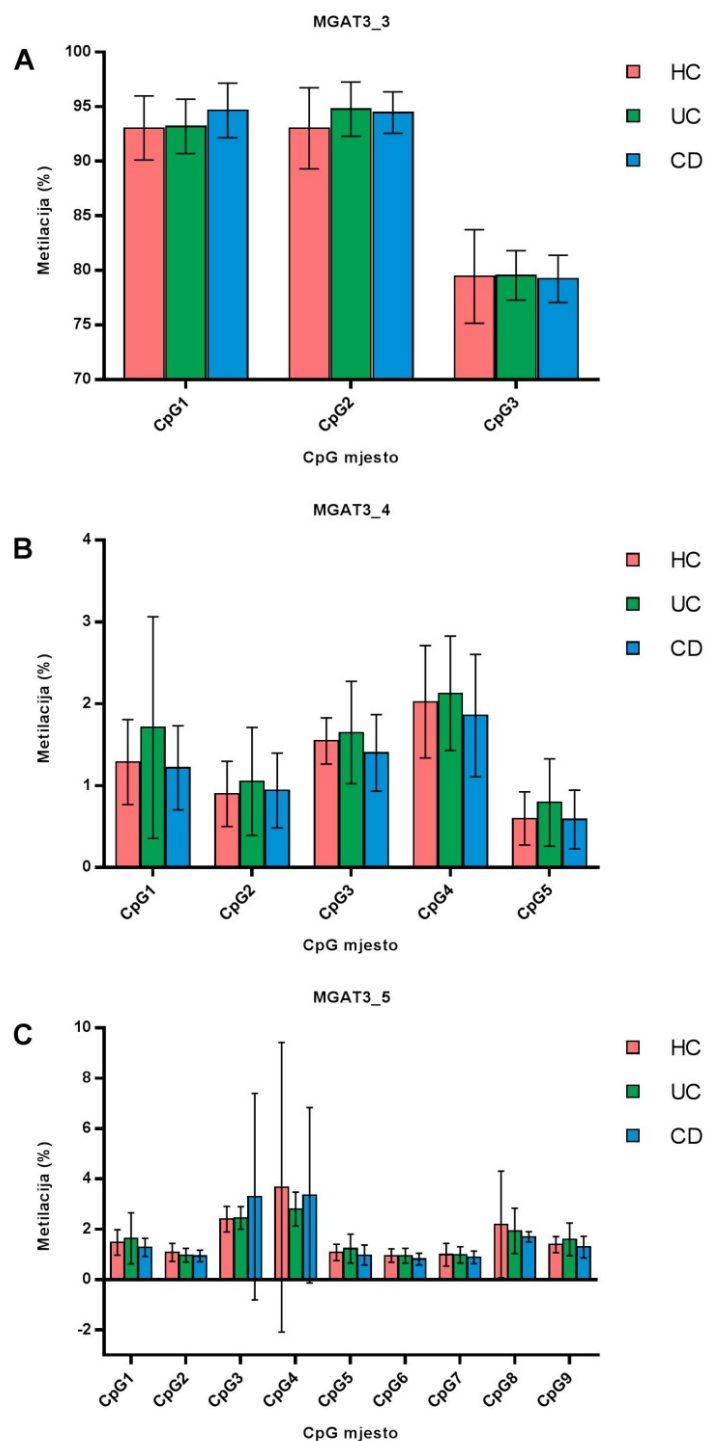
### 4.1. Analiza metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* uzoraka iz kohorti Edinburgh i Firenza

U prvom dijelu istraživanja je analizirana CpG metilacija gena *MGAT3* i *MGAT5* pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti (CD, od engl. *Crohn's disease*) i ulceroznog kolitisa (UC, od engl. *ulcerative colitis*) te kontrolnih ispitanika (HC, od engl. *healthy controls*). U tu svrhu je korištena metoda bisulfitnog pirosekvenciranja kojom se kvantitativno određuje omjer ugrađenih C i T nukleotida te se kao konačan rezultat dobije postotak metilacije za svako pojedino CpG mjesto. Svi fragmenti gena *MGAT3* (1, 2, 3, 4, 5) i *MGAT5* (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) su analizirani ovom metodom na DNA iz stanica pune krvi uzoraka iz kohorte Edinburgh. Većina CpG mjesta unutar fragmenata 1 i 2 gena *MGAT3* i fragmenta 7 gena *MGAT5* pokazala je značajno promijenjenu metilaciju između pacijenata s IBD-em i kontrolnih ispitanika unutar kohorte Edinburgh. Kako bi bili sigurni da su ove razlike stvarne, metilacija gena *MGAT3* i *MGAT5* analizirana je pomoću istih testova metilacije (fragmenti 1 i 2, odnosno fragment 7) i istom metodom na uzorcima iz druge neovisne kohorte Firenza. Također, u kohorti Edinburgh iz pune krvi su izolirani CD19+ B-limfociti te je analizirana metilacija gena *MGAT3* i *MGAT5* iz DNA ovih stanica. Treba naglasiti da uzorci na kojima je analizirana metilacija gena *MGAT3* i *MGAT5* iz pune krvi i B-limfocita nisu isti. Provedena je statistička analiza kako bi se utvrdilo jesu li razlike u stupnju metilacije DNA značajne između pojedinih skupina- pacijenata i kontrolnih ispitanika, te pacijenata međusobno (UC i CD). Korišten je neparametrijski Mann-Whitney U test. Statistički značajne vrijednosti su one koje su se razlikovale na razini  $p < 0.05$  pri čemu je provedena Bonferronijeva korekcija. Vrijednost  $p$  je korigirana za broj analiziranih CpG mjesta. Za fragment 1 gena *MGAT3* je razina značajnosti iznosila  $p < 0.005$ , za fragment 2 gena *MGAT3*  $p < 0.01$  te za fragment 7 gena *MGAT5*  $p < 0.0125$ . CpG metilacija svih analiziranih fragmenata gena *MGAT3* i *MGAT5* na uzorcima iz kohorti Edinburgh i Firenza je prikazana na Slikama 9 do 15.

#### 4.1.1. Analiza metilacije gena *MGAT3*

Sekvence fragmenata 3, 4 i 5 gena *MGAT3* obuhvaćaju ukupno 17 CpG mjesta. Stupanj metilacije niti na jednom CpG mjestu u ovim fragmentima nije bio značajno promijenjen između pacijenata oboljelih od IBD-a u odnosu na kontrolne ispitanike, kao niti između dviju grupa pacijenata (CD i UC) kohorte Edinburgh (Slika 9). Iz tog razloga ovi fragmenti nisu uzeti u daljnjim istraživanjima. Broj analiziranih uzoraka je prikazan u Tablici 1. Metilacija svih analiziranih CpG mjesta fragmenta 3 je visoka (vrijednosti između 79% i

95%, Slika 9A), dok fragmenti 4 i 5 pokazuju nisku metilaciju DNA (vrijednosti ispod 4%, Slika 9B i C).



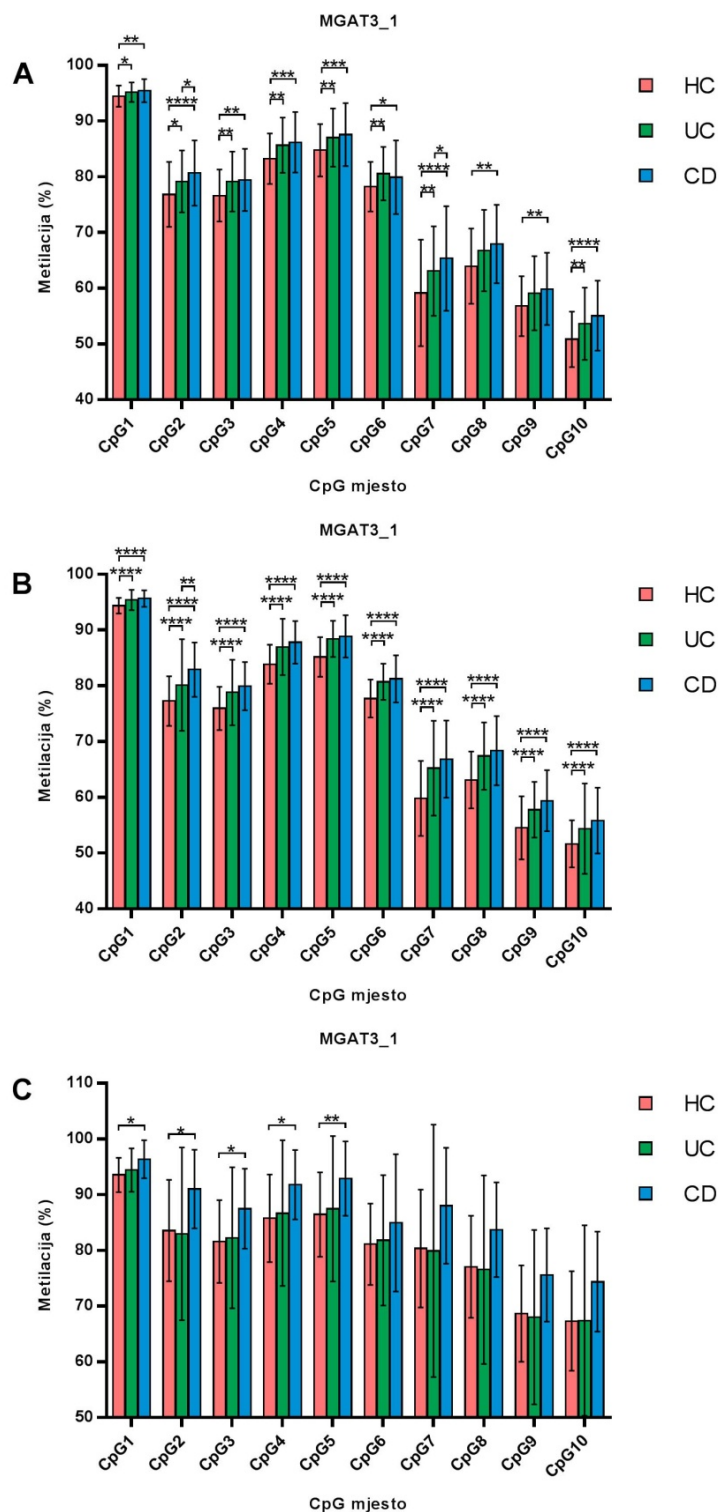
**Slika 9. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenata 3 (A), 4 (B) i 5 (C) gena *MGAT3* (kohorta Edinburgh).** Za analizu metilacije korištena je DNA iz pune krvi pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti (CD) i ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom.

Za razliku od fragmenata 3, 4 i 5 gena *MGAT3*, stupanj metilacije CpG mjesta u fragmentu 1 razlikovao se između pacijenata i kontrolnih ispitanika te je iz tog razloga ovaj fragment analiziran na većem broju uzoraka (66 HC, 165 UC, 71 CD, Tablica 1). Svih deset CpG mjesta unutar fragmenta 1, koji se nalazi u promotoru gena *MGAT3* (Slika 7), pokazuju visoki stupanj metilacije u uzorcima svih skupina (HC, UC, CD). Raspon metilacije za prvih šest mjesta je 76%-96%, odnosno 50%-68% za zadnja četiri mjesta (Slika 10A). Zabilježen je porast stupnja metilacije na svih deset CpG mjesta u pacijenata s CD-om i UC-om u odnosu na kontrolne ispitanike. Te su razlike više izražene u CD-u, nego u UC-u. Svih deset CpG mjesta pokazuju značajno veću metilaciju u CD-u u odnosu na HC s najznačajnijom razlikom od 6.19% (CpG7), dok u UC-u razliku u metilaciji pokazuje osam CpG mjesta s najznačajnijom razlikom od 2.42% (CpG4). Iako se metilacija za većinu CpG mjesta ne razlikuje značajno kada se usporede skupine bolesnika s CD-om i UC-om, vidljivo je da je hipermetilacija fragmenta 1 gena *MGAT3* u CD-u izraženija, nego u UC-u gotovo na svim analiziranim CpG mjestima.

U kohorti Firenza analizirano je 407 uzoraka (147 HC, 99 UC, 161 CD, Tablica 1) te je stupanj metilacije svih CpG mjesta unutar fragmenta 1 gena *MGAT3* bio visok (vrijednosti u rasponu od 75% do 96% za prvih šest CpG mjesta, te između 51% i 69% za sljedeća četiri CpG mjesta, Slika 10B) za sve analizirane skupine, slično kao i na uzorcima iz Edinburgha. Stupanj metilacije na svih deset CpG mjesta bio je viši u CD-u i UC-u u odnosu na HC te je statistička analiza pokazala kako su te promjene značajne za sva analizirana CpG mjesta. Najznačajnija razlika u CD-u iznosi 5.66% (CpG2), a u UC-u 3.12% (CpG4). Uočeno je da je metilacija na svim CpG mjestima unutar fragmenta 1 viša u CD-u u odnosu na UC, no ta je razlika značajna samo za jedno mjesto (CpG2).

Na Slici 10C su prikazani rezultati analize metilacije fragmenta 1 gena *MGAT3* na uzorcima B-limfocita iz kohorte Edinburgh. Analizirano je ukupno 65 uzoraka (29 HC, 17 UC, 19 CD, Tablica 1). Stupanj metilacije bio je visok na svim analiziranim CpG mjestima u sve tri skupine s vrijednostima između 67% i 97%. U slučaju UC-a, razlike u stupnju metilacije iznosile su svega oko 1% što nije značajno. Nasuprot tome, u CD-u je zabilježena hipermetilacija na svim analiziranim CpG mjestima u odnosu na HC. Razlike se kreću od 2.8% do 7.7%. Značajnu razliku pokazuje prvih pet CpG mjesta (najznačajnija razlika iznosi 6.45% za CpG5). Usporedbom dviju skupina bolesnika (CD i UC) nije ustanovljena značajna razlika stupnja metilacije.

Uspoređujući obrazac metilacije fragmenta 1 gena *MGAT3* iz B-limfocita s obrascem metilacije iz pune krvi, uočene su sličnosti (Slika 10). Primjerice, mjesto CpG1 pokazuje najviše vrijednosti metilacije. Razina metilacije se potom smanjuje za mjesta CpG2 i CpG3, zatim sljedeća dva mjesta pokazuju višu metilaciju u odnosu na prethodna dva mjesta i zatim se razina metilacije za mjesto CpG6 ponovno smanjuje. Ovakav obrazac metilacije CpG mjesta unutar fragmenta 1 pokazuje DNA pune krvi u obje kohorte (Edinburgh i Firenza) kao i DNA B-limfocita. Dok je metilacija iz krvi za mjesta CpG7 i CpG8 niža u odnosu na CpG6, to nije slučaj za B-limfocite, no mjesta CpG9 i CpG10 pokazuju najnižu metilaciju i prate obrazac vidljiv u krvi. Za razliku od UC-a, za CD je zabilježena hipermetilacija u odnosu na HC kao i u punoj krvi. Stupanj CpG metilacije DNA iz pune krvi je generalno nešto niži u odnosu na stupanj metilacije DNA iz B-limfocita (primjerice, 50% naspram 67%). Također, dok većina CpG mjesta pokazuje značajne razlike u DNA iz krvi, u B-limfocitima samo pet mjesta pokazuju značajnu razliku i to između CD-a i HC-a.



**Slika 10. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 1 gena *MGAT3*.** Prikazan je stupanj metilacije na 10 CpG mjestima. Za analizu metilacije korištena je DNA iz pune krvi kohorte Edinburgh (**A**) i kohorte Firenze (**B**) te DNA iz CD19+ B-limfocita iz krvi (**C**) pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti (CD) i ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.005$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ ; \*\*\*\* $p < 1 \cdot 10^{-5}$ ).



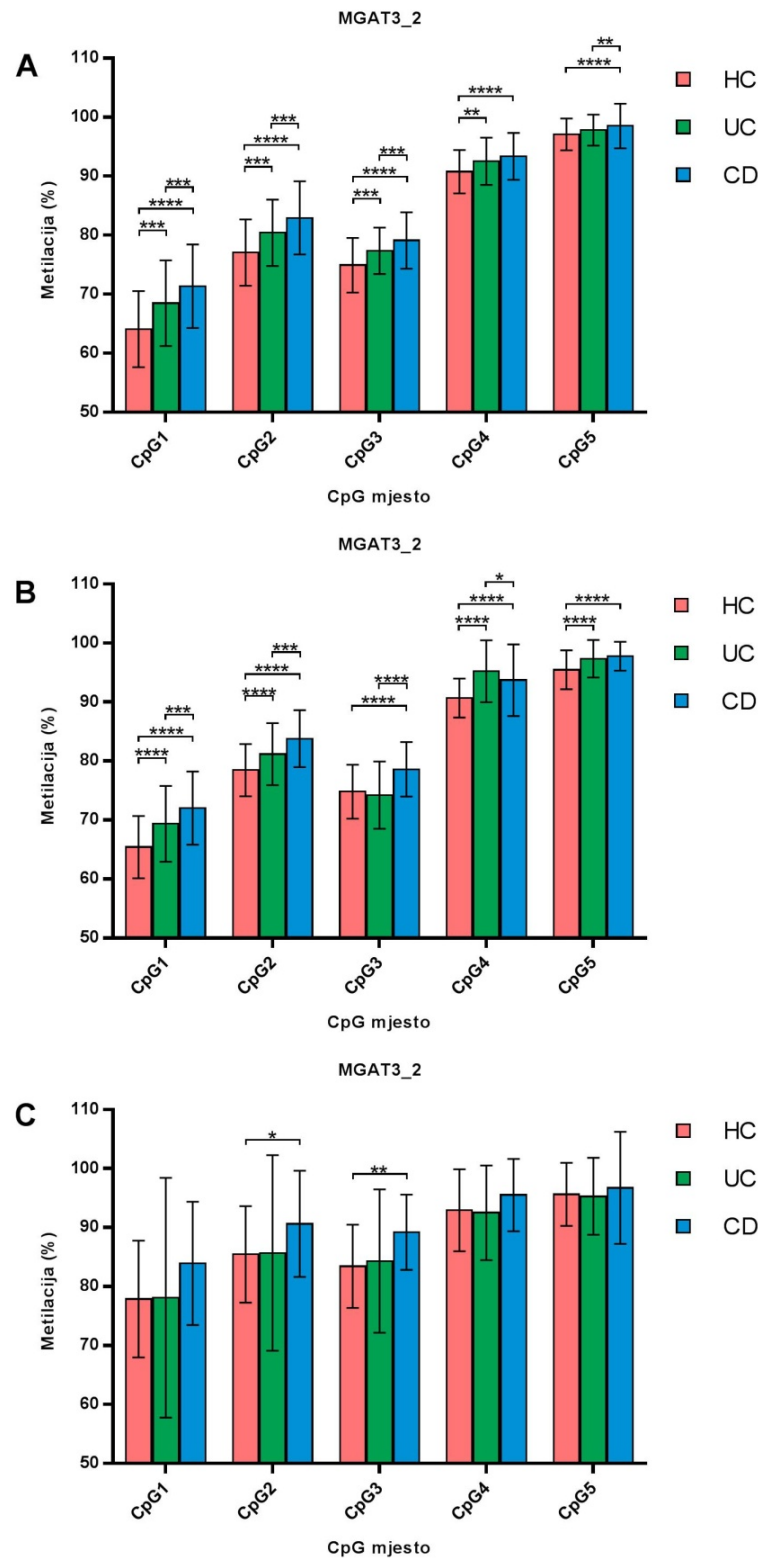
Stupanj metilacije pet CpG mjesta unutar fragmenta 2, koji se nalazi u promotora gena *MGAT3* (Slika 7), bio je značajno različit između pacijenata i kontrolnih ispitanika pa je ovaj fragment analiziran na većem broju uzoraka (ukupno 286 uzoraka iz kohorte Edinburgh- 73 HC, 148 UC, 65 CD, Tablica 1). Stupanj metilacije na svih pet CpG mjesta bio je visok s vrijednostima između 64% i 83% za prva tri mjesta, te između 90% i 99% za mjesta CpG4 i CpG5 (Slika 11A). Sva CpG mjesta fragmenta 2 pokazuju hipermetilaciju u skupinama CD i UC u odnosu na HC. Razlika u CpG metilaciji u CD-u u odnosu na HC je značajna za sva CpG mjesta s najznačajnijom razlikom od 7.28% (CpG1). U UC-u, prva četiri CpG mjesta pokazuju značajno veću metilaciju u odnosu na HC. Uočene razlike su manje nego u slučaju CD-a te najznačajnija razlika iznosi 4.4% (CpG1). Usporedba stupnja metilacije između skupina CD i UC pokazala je da je metilacija u skupini CD značajno veća za četiri od pet analiziranih CpG mjesta gdje je najznačajnija razlika iznosila 1.77% (CpG3).

Na Slici 11B prikazan je stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 2 gena *MGAT3* na uzorcima iz kohorte Firenza. Analiziran je ukupno 371 uzorak (134 HC, 130 UC, 107 CD, Tablica 1). Obrazac metilacije bio je vrlo sličan onome iz kohorte Edinburgh. Naime, vrijednosti metilacije prva tri CpG mjesta za sve analizirane skupine (HC, UC, CD) su između 65% i 84%, dok sljedeća dva CpG mjesta imaju više vrijednosti metilacije (90%-98%). Stupanj metilacije u skupinama CD i UC uglavnom je bio povećan na svim CpG mjestima u usporedbi s HC-om. Razlika u metilaciji za CD u odnosu na HC pokazuje značajnost za svih pet CpG mjesta s najznačajnijom razlikom od 6.61% (CpG1), odnosno za četiri CpG mjesta u UC-u s najznačajnijom razlikom od 4.54% (CpG4). Razlika u metilaciji između CD-a i UC-a se pokazala značajnom za prva četiri CpG mjesta pri čemu je metilacija viša u CD-u za mjesta CpG1-CpG3, a manja za mjesto CpG4. Vidljiva promjena je najznačajnija za mjesto CpG3 s razlikom od 4.38%.

Stupanj metilacije CpG mjesta unutar fragmenta 2 gena *MGAT3* iz B-limfocita su prikazani na Slici 11C. Analiza je provedena na ukupno 67 uzoraka (29 HC, 18 UC, 20 CD, Tablica 1). Metilacija je visoka na svim analiziranim mjestima za sve analizirane skupine s vrijednostima između 77% i 97%. Slično kao i za fragment 1, metilacija u UC-u je na nekim CpG mjestima viša u odnosu na HC, a na nekim mjestima niža s maksimalnim razlikama do 1% koje nisu značajne. U CD-u zabilježene su više vrijednosti metilacije na svim CpG mjestima u odnosu na HC pri čemu su samo dva CpG mjesta pokazala značajnu razliku koja

iznosi 5.15% (CpG2) i 5.8% (CpG3). U CD-u su CpG mjesta unutar fragmenta 2 više metilirana u odnosu na UC, ali ta razlika u stupnju metilacije nije značajna.

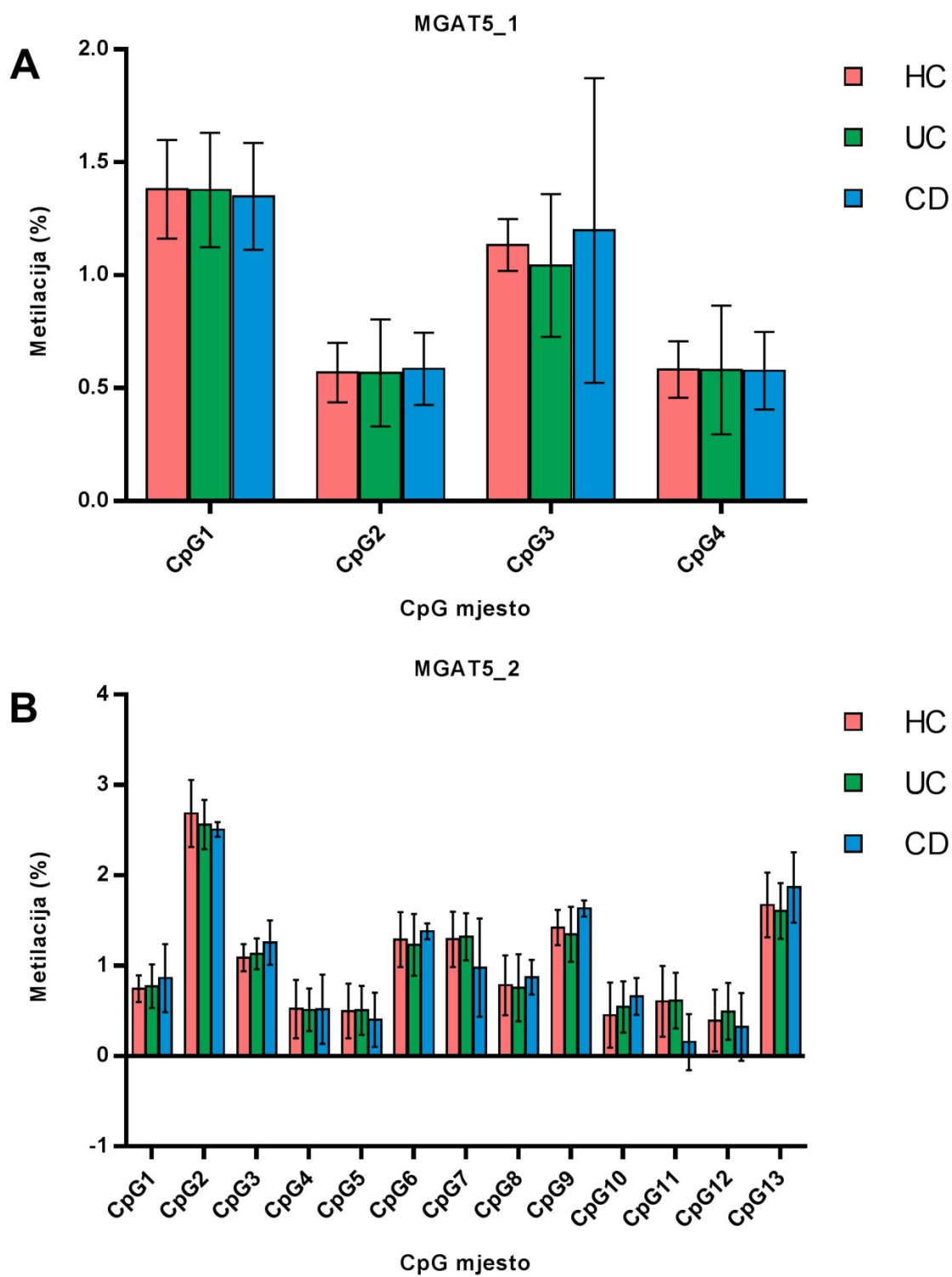
Obrazac metilacije fragmenta 2 gena *MGAT3* iz B-limfocita je sličan obrascu metilacije iz pune krvi (Slika 11). Naime, fragment obuhvaća pet CpG mjesta pri čemu svako mjesto pokazuje višu razinu metilacije u odnosu na prethodno, s iznimkom mjesta CpG3 koje ima nižu metilaciju u odnosu na mjesto CpG2. Izražena je hipermetilacija u CD-u u odnosu na HC i u B-limfocitima i u punoj krvi. U UC-u nije zabilježena hipermetilacija u odnosu na HC na DNA iz B-limfocita, za razliku od DNA iz pune krvi. Osim toga, stupanj metilacije na pet CpG mjesta u DNA iz krvi je niži u odnosu na onaj iz B-limfocita (64% naspram 77%). Također, dok većina CpG mjesta pokazuje značajne razlike u DNA iz krvi, u B-limfocitima samo dva mjesta pokazuju značajnu razliku i to između CD-a i HC-a.



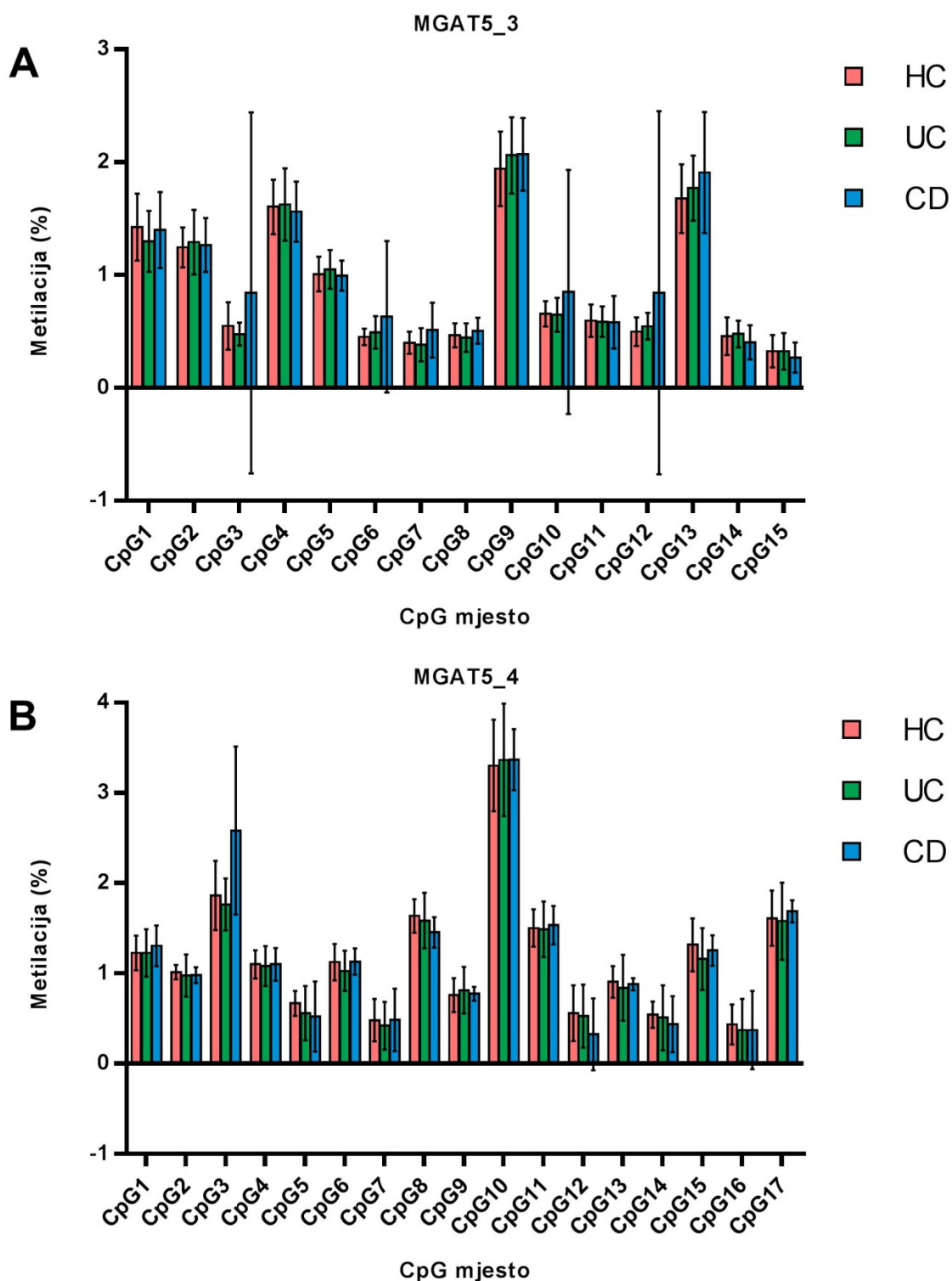
**Slika 11. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 2 gena *MGAT3*.** Prikazan je stupanj metilacije na pet CpG mjesta. Za analizu metilacije korištena je DNA iz pune krvi kohorte Edinburgh (**A**) i kohorte Firenza (**B**) te DNA iz CD19+ B-limfocita iz krvi (**C**) pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti (CD) i ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.002$ ; \*\*\* $p < 0.0002$ ; \*\*\*\* $p < 2 \cdot 10^{-5}$ ).

#### 4.1.2. Analiza metilacije gena *MGAT5*

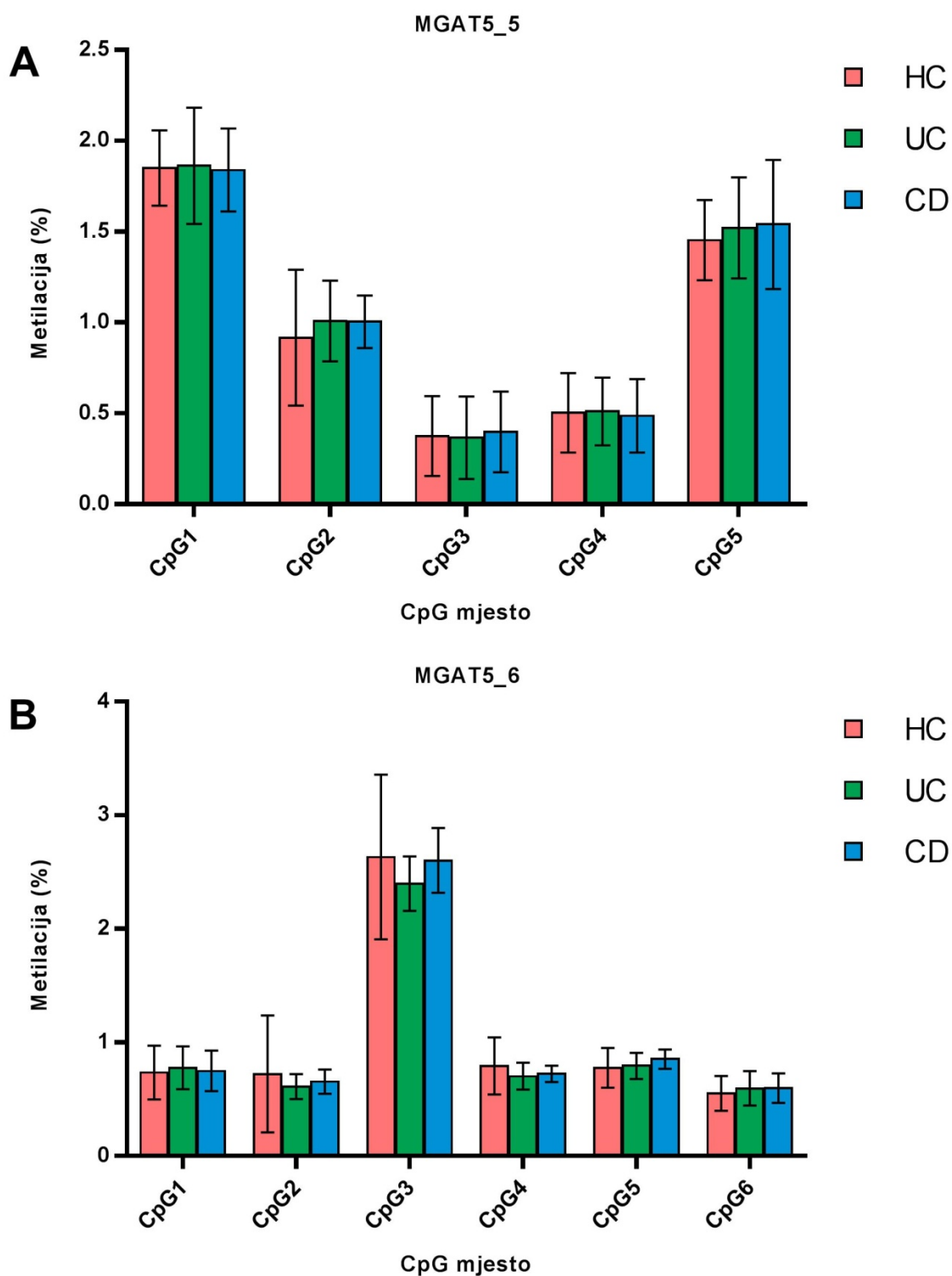
Svi fragmenti gena *MGAT5* u kojima je analizirana CpG metilacija, osim fragmenta 7, pokazuju niski stupanj metilacije (vrijednosti ispod 4%) u svim skupinama. Broj analiziranih uzoraka je prikazan u Tablici 1. Metilacijski testovi (fragmenti 1-6, Slika 8) sadrže ukupno 61 CpG mjesto. Za fragment 1 prikazana je metilacija za četiri CpG mjesta od analiziranih pet. Mjesto CpG3 nije prikazano zbog loše kvalitete rezultata. Razlike u stupnju CpG metilacije u fragmentima 1-6 nisu bile značajne između različitih skupina (CD, UC i HC), stoga oni nisu uzeti u daljnjim istraživanjima. Rezultati analize CpG metilacije u fragmentima 1-6 gena *MGAT5* su prikazani na Slikama 12, 13 i 14.



Slika 12. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenata 1 (A) i 2 (B) gena *MGAT5* (kohorta Edinburgh). Za analizu metilacije korištena je DNA iz pune krvi pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti (CD) i ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom.



**Slika 13. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenata 3 (A) i 4 (B) gena *MGAT5* (kohorta Edinburgh).** Za analizu metilacije korištena je DNA iz pune krvi pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti (CD) i ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom.



**Slika 14. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenata 5 (A) i 6 (B) gena *MGAT5* (kohorta Edinburgh).** Za analizu metilacije korištena je DNA iz pune krvi pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti (CD) i ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom.

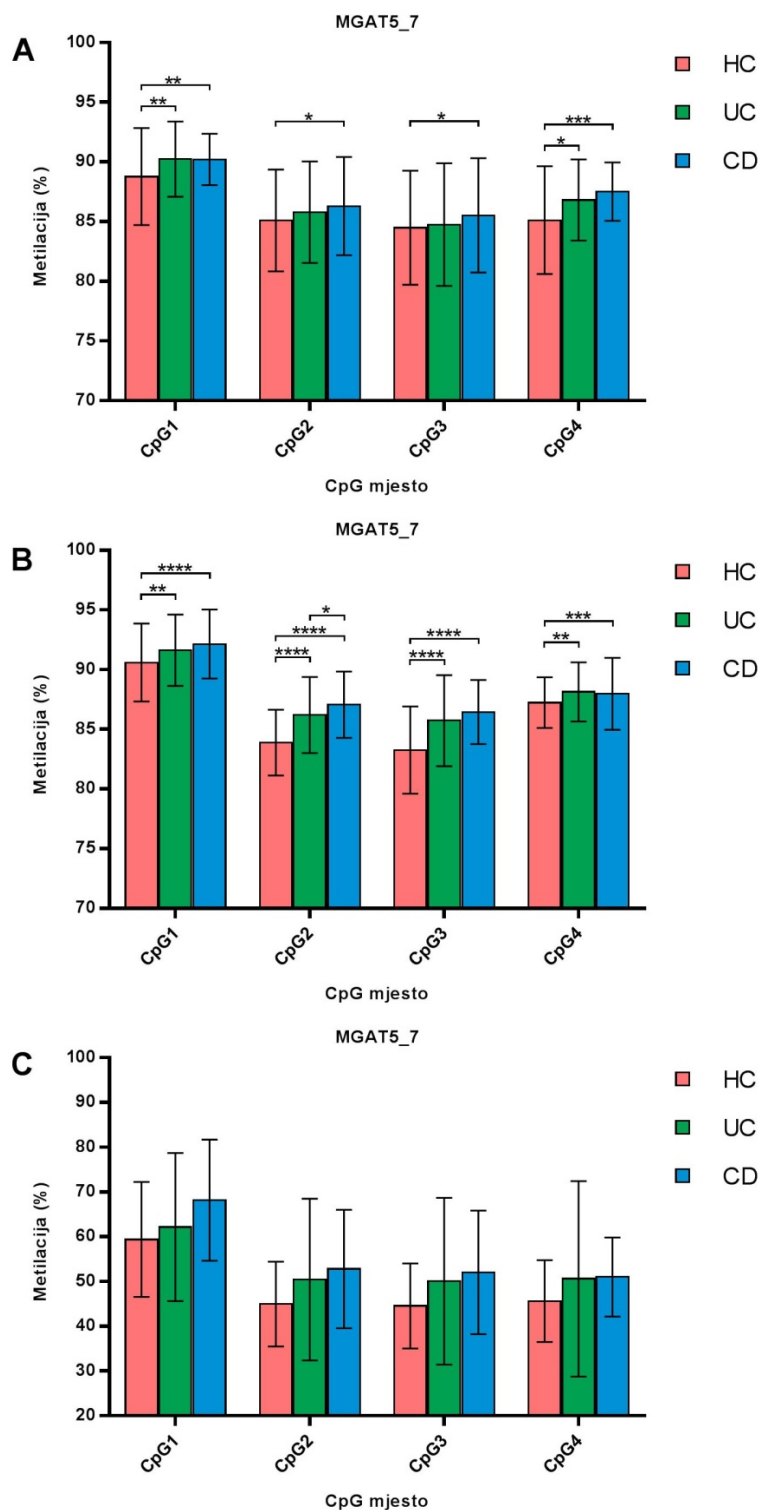
Testna analiza na manjem broju uzoraka pokazala je da se stupanj metilacije CpG mjesta unutar fragmenta 7, koji se nalazi u prvom intronu gena *MGAT5* (Slika 8), razlikuje između skupina (CD, UC i HC) te je zbog toga ovaj fragment korišten u daljnjoj analizi na većem broju uzoraka. Analiza je uključila 374 uzorka iz kohorte Edinburgh (81 HC, 210 UC, 83 CD, Tablica 1). Stupanj metilacije na sva 4 CpG mjesta koja sadrži ovaj fragment bio je visok (između 84% i 91%, Slika 15A). U odnosu na kontrolne ispitanike, u pacijenata s CD-om i UC-om metilacija je bila povećana na svim analiziranim mjestima. Sva četiri CpG mjesta pokazuju značajno veću metilaciju u CD-u u odnosu na HC s najznačajnijom razlikom od 2.4% (CpG4). U UC-u mjesta CpG1 i CpG4 pokazuju značajno veću metilaciju u odnosu na HC pri čemu mjesto CpG1 pokazuje značajniju razliku u metilaciji (1.47%). Metilacija između UC-a i CD-a se nije pokazala značajnom.

Ovi rezultati potvrđeni su analizom CpG metilacije upotrebom metilacijskog testa 7 gena *MGAT5* i na drugoj neovisnoj kohorti (Firenza) koja je sadržavala 463 uzorka (150 HC, 175 UC, 138 CD, Tablica 1). Stupanj metilacije na sva četiri CpG mjesta koja sadrži ovaj fragment bio je visok (u rasponu od 83% do 93%, Slika 15B). Kao i u slučaju kohorte Edinburgh, vidljiva je hipermetilacija na svim analiziranim mjestima u pacijenata s CD-om i UC-om u odnosu na kontrolne ispitanike. Stupanj metilacije na sva četiri CpG mjesta bio je značajno veći u oba tipa bolesti u odnosu na HC. Najznačajnija razlika u CD-u iznosi 3.18% (CpG2), a u UC-u 2.33% (CpG2). Na Slici 15B može se uočiti razlika u stupnju metilacije mjesta CpG4 u CD-u i UC-u. U CD-u je nešto niža u odnosu na UC, dok je na svim ostalim mjestima viša. Značajnu razliku u metilaciji između ova dva tipa bolesti pokazuje jedino mjesto CpG2 s razlikom od 0.85%.

Na Slici 15C su prikazani rezultati analize CpG metilacije fragmenta 7 gena *MGAT5* na uzorcima B-limfocita iz kohorte Edinburgh. Analizirano je 67 uzoraka (28 HC, 19 UC, 20 CD, Tablica 1). Stupanj metilacije na svim CpG mjestima i u svim skupinama kretao se u rasponu vrijednosti između 44% i 69%. Sva CpG mjesta su hipermetilirana u CD-u i UC-u u odnosu na HC pri čemu razlike dosežu do 8.8% za CD i 5.5% za UC, no nisu značajne. Usporedbom dviju skupina bolesnika (CD i UC) nije ustanovljena značajna razlika stupnja metilacije.



Obrazac metilacije fragmenta 7 gena *MGAT5* je sličan za B-limfocite i punu krv (Slika 15). Vidljiva je i hipermetilacija UC-a i CD-a u odnosu na HC kao i u punoj krvi. Ipak, dok su razlike u stupnju CpG metilacije na DNA iz pune krvi bile značajne između skupina, iste nisu potvrđene analizirajući CpG metilaciju na DNA iz B-limfocita. Također, stupanj metilacije analiziranih CpG mjesta je niži u odnosu na punu krv- u B-limfocitima se vrijednosti kreću između 48% i 63%, a u punoj krvi između 84% i 89% u kohorti Edinburgh, odnosno između 85% i 92% u kohorti Firenza.



**Slika 15. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 7 gena *MGAT5*.** Prikazan je stupanj metilacije na četiri CpG mjesta. Za analizu metilacije korištena je DNA iz pune krvi kohorte Edinburgh (A) i kohorte Firenze (B) te DNA iz CD19+ B-limfocita iz krvi (C) pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti (CD) i ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.0125$ ; \*\* $p < 0.0025$ ; \*\*\* $p < 2.5 \cdot 10^{-4}$ ; \*\*\*\* $p < 2.5 \cdot 10^{-5}$ ).

## 4.2. Korelacijske analize metilacije DNA i glikozilacije imunoglobulina G

Podaci metilacije DNA iz krvi i podaci *N*-glikozilacije IgG-a iz plazme istih pojedinaca iz kohorti Edinburgh i Firenza su korelirani. S glikanima IgG-a su korelirani podaci CpG metilacije dobiveni samo onim metilacijskim testovima koji su pokazali razlike između različitih skupina (HC, UC, CD). Korišten je Pearsonov koeficijent korelacije čija se vrijednost kretala od -0.3 do +0.3 te je provedena Bonferronijeva korekcija nakon čega je granična razina značajnosti postavljena na  $p < 0.003$ . Ovom analizom se nastojalo utvrditi je li epigenetička regulacija (u ovom slučaju CpG metilacija) gena *MGAT3* uključena u uspostavljanje glikozilacijskog uzorka IgG-a. Dobivene korelacije prikazane su na Slici 16A.

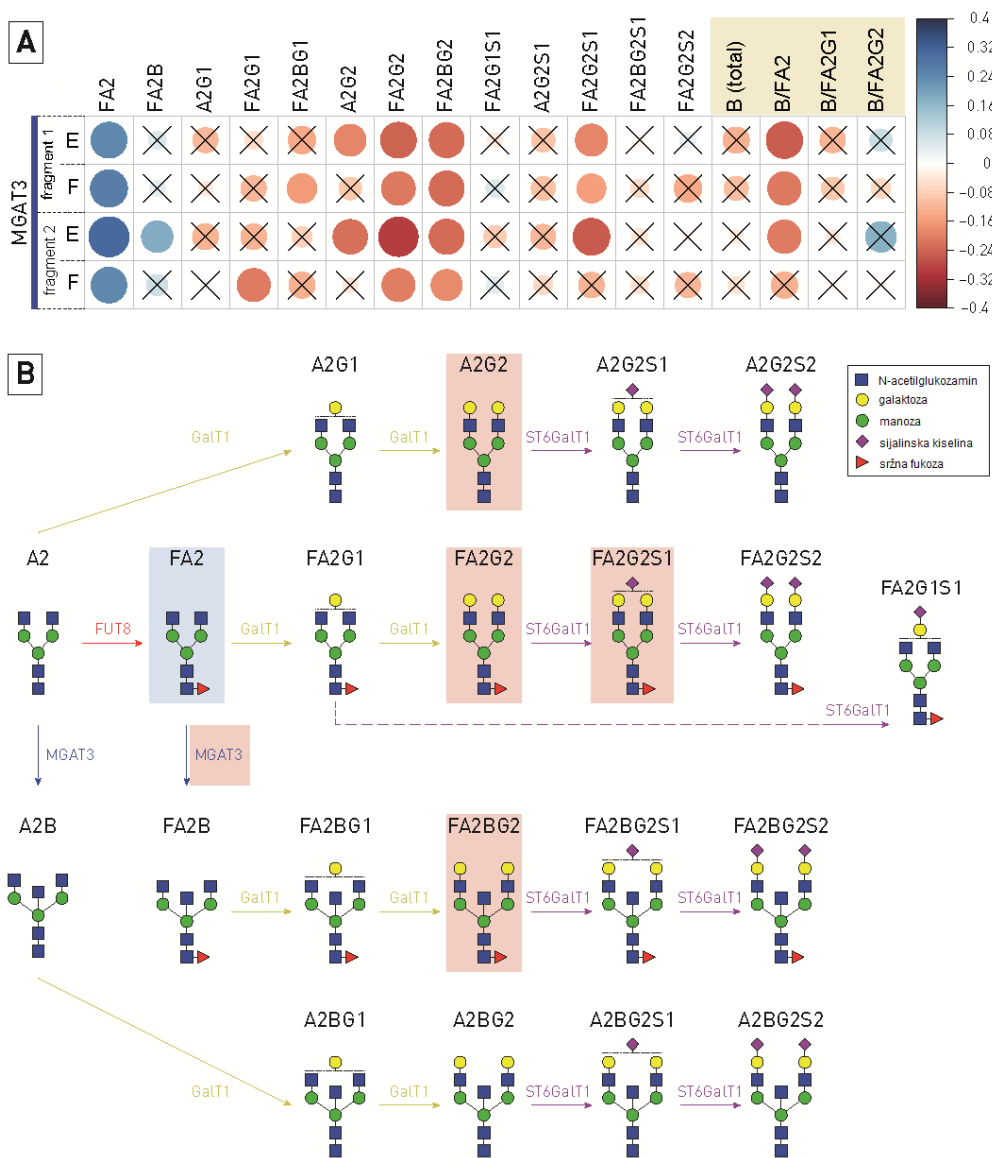
Struktura FA2 pokazuje pozitivnu korelaciju s podacima CpG metilacije za oba analizirana fragmenta gena *MGAT3* te su rezultati iz kohorte Edinburgh potvrđeni i u kohorti Firenza. Djelovanjem enzima GnT-III (kodiran genom *MGAT3*) na strukturu FA2 nastaje struktura FA2B koja sadrži rasijecajući GlcNAc, kao što je vidljivo na Slici 16B koja prikazuje biosintetski put glikana. Ova struktura također pozitivno korelira s metilacijom gena *MGAT3*, no nešto slabije, i to samo za fragment 2 u kohorti Edinburgh. Sve ostale strukture koje su pokazale značajnu korelaciju- negativno su korelirane s metilacijom gena *MGAT3*.

U biosintezi glikana, struktura FA2 se nadograđuje djelovanjem enzima GalT1 koji dodaje galaktozu te nastaje struktura FA2G1 s jednom vezanom galaktozom, a daljnim djelovanjem ovog enzima nastaje struktura FA2G2 s dvije vezane galaktoze. Obje strukture pokazuju negativnu korelaciju s metilacijom gena *MGAT3* s time da je FA2G1 negativno korelirana s metilacijom samo jednog fragmenta u samo jednoj kohorti uzoraka, dok je za FA2G2 vidljiva negativna korelacija za oba fragmenta te za obje analizirane kohorte uzoraka. Slične korelacije pokazuju i strukture FA2BG1 i FA2BG2. Razlika između ovih i prethodno opisanih struktura je prisutnost rasijecajućeg GlcNAc. Kao i u slučaju struktura FA2G1 i FA2G2, struktura koja sadrži jednu galaktozu (FA2BG1) pokazuje negativnu korelaciju samo u slučaju jednog fragmenta i samo u jednoj kohorti uzoraka, dok struktura s dvije vezane galaktoze (FA2BG2) negativno korelira s oba fragmenta gena *MGAT3* u obje kohorte uzoraka. FA2G2 također pokazuje negativnu korelaciju za oba fragmenta gena *MGAT3* u kohorti Edinburgh, no to nije potvrđeno u kohorti Firenza. Negativna korelacija je uočena i za strukturu FA2G2S1 koja, osim dvije vezane galaktoze, sadrži i sijalinsku kiselinu. Rezultati korelacije slični su kao i za strukturu iz koje nastaje (FA2G2) (zabilježena korelacija u obje kohorte). Metilacija oba fragmenta gena *MGAT3* pokazuje negativnu korelaciju s ovom

strukturu u kohorti Edinburgh, no u kohorti Firenza jedino metilacija fragmenta 1 korelira sa strukturu FA2G2S1. Ostale sijalinizirane strukture nisu pokazale značajnu korelaciju s metilacijom gena *MGAT3*.

Analizirane su i korelacije metilacije i deriviranih svojstava glikana. Strukture koje sadrže rasijecajući GlcNAc (B (total), Slika 16B), koje sintetizira enzim kodiran genom *MGAT3*, nisu pokazale korelaciju s metilacijom gena *MGAT3*. Omjeri struktura FA2BG1/FA2G1 i FA2BG2/FA2G2 pokazuju prisutnost rasijecajućeg GlcNAc, čime daju informaciju o aktivnosti enzima GnT-III, no rezultati se nisu pokazali značajnima. Omjer struktura FA2B/FA2 također daje informaciju o aktivnosti GnT-III, no ove strukture su izravno povezane s djelovanjem enzima GnT-III. Metilacija fragmenata 1 i 2 gena *MGAT3* pokazala je negativnu korelaciju s ovim omjerom s time da je u slučaju fragmenta 1 ovakva korelacija vidljiva u obje kohorte.

Sumarno, podaci metilacije DNA su korelirani s podacima *N*-glikozilacije IgG-a iz kohorti Edinburgh i Firenza. Kao što je vidljivo na Slici 16, pozitivnu korelaciju su pokazale strukture FA2 i FA2B, a negativnu korelaciju strukture koje sadrže jednu ili dvije galaktoze i sijalinsku kiselinu, a koje nastaju iz struktura FA2 i FA2B. Uz njih, negativnu korelaciju pokazala je i struktura A2G2 koja nastaje dodavanjem dviju galaktozi na ishodišnu strukturu A2. Metilacija gena *MGAT3* je negativno korelirana i s omjerom FA2B/FA2. Struktura FA2B nastaje djelovanjem enzima GnT-III (kodiran genom *MGAT3*) na strukturu FA2 pa korelacija metilacije gena *MGAT3* s omjerom ovih struktura daje informaciju o aktivnosti GnT-III.



**Slika 16. Korelacijske analize metilacije fragmenata 1 i 2 gena *MGAT3* i glikozilacije imunoglobulina G (A).** Analiza uzoraka iz kohorti Edinburgh (E) i Firenza (F). Korelacije između srednje vrijednosti metilacije i udjela pojedinih glikanskih struktura prikazane su plavim (pozitivna korelacija) i crvenim krugovima (negativna korelacija) pri čemu su veličina kruga i nijansa boje proporcionalni korelacijskim koeficijentima. Korišten je Pearsonov koeficijent korelacije. Granična vrijednost statističke značajnosti bila je  $p < 0.05$  uz Bonferronijevu korekciju. Prekriženi krugovi predstavljaju rezultate koji nisu statistički značajni. Kolone predstavljaju 13 glikanskih struktura i 4 derivirana parametra (smeđi kvadrat). A2- srž glikana koja se sastoji od dva N-acetilglukozamina (GlcNAc) i tri manoze na koju su vezana dva dodatna GlcNAc, B- rasijecajući GlcNAc, F- sržna fukoza, G- galaktoza, S- sijalinska kiselina. B u smeđem kvadratu predstavlja postotak struktura koje sadrže rasijecajući GlcNAc. **Biosintetski put glikana (B)** s naznačenim glikanskim strukturama i nazivima enzima. Bojom su istaknute strukture koje odgovaraju statistički značajnim korelacijama. Plava boja označava pozitivnu, a crvena negativnu korelaciju. Crveni kvadrat oko *MGAT3* označava korelaciju između metilacije gena *MGAT3* i omjera FA2B/FA2.

#### 4.3. Analiza metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* uzoraka iz kohorte Porto

U drugom dijelu istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, analiziran je stupanj metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* u uzorcima kohorte Porto koji su obuhvaćali mononuklearne stanice periferne krvi (u daljnjem tekstu: stanice krvi) i CD3+ T-limfocite iz krvi te tkiva crijeva s mjesta upale pacijenata s UC-om te kontrolnih ispitanika. Broj uzoraka iz ove kohorte bio je malen (Tablica 2), no vrijednost ove kohorte je u dostupnosti DNA T-limfocita s mjesta upale crijeva, te mogućnost usporedbe obrasca CpG metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* iz krvi s obrascem CpG metilacije ovih gena u tkivu crijeva zahvaćenog upalom. Usprkos malom broju uzoraka pacijenti su bili stratificirani u dvije grupe s obzirom na stadij bolesti- pacijenti s aktivnim i pacijenti s inaktivnim oblikom UC-a. Osim toga, napravljena je i podjela pacijenata prema terapiji: 1) pacijenti koji nisu primali terapiju, 2) pacijenti koji su primali standardnu terapiju, 3) pacijenti koji su primali anti-TNF terapiju. Ovakva podjela napravljena je da bi se vidjelo mijenja li se metilacija gena *MGAT3* i *MGAT5* s obzirom na terapiju.

Za analizu CpG metilacije u kohorti Porto korišteni su samo oni metilacijski testovi gena *MGAT3* i *MGAT5* koji su pokazali značajne razlike u kohortama Edinburgh i Firenza. U svrhu statističke analize upotrijebljen je neparametrijski Mann-Whitney U test kako bi se utvrdilo jesu li razlike u stupnju metilacije DNA značajne između pojedinih ispitivanih skupina. Statistički značajne vrijednosti su one koje su se razlikovale na razini  $p < 0.05$ .

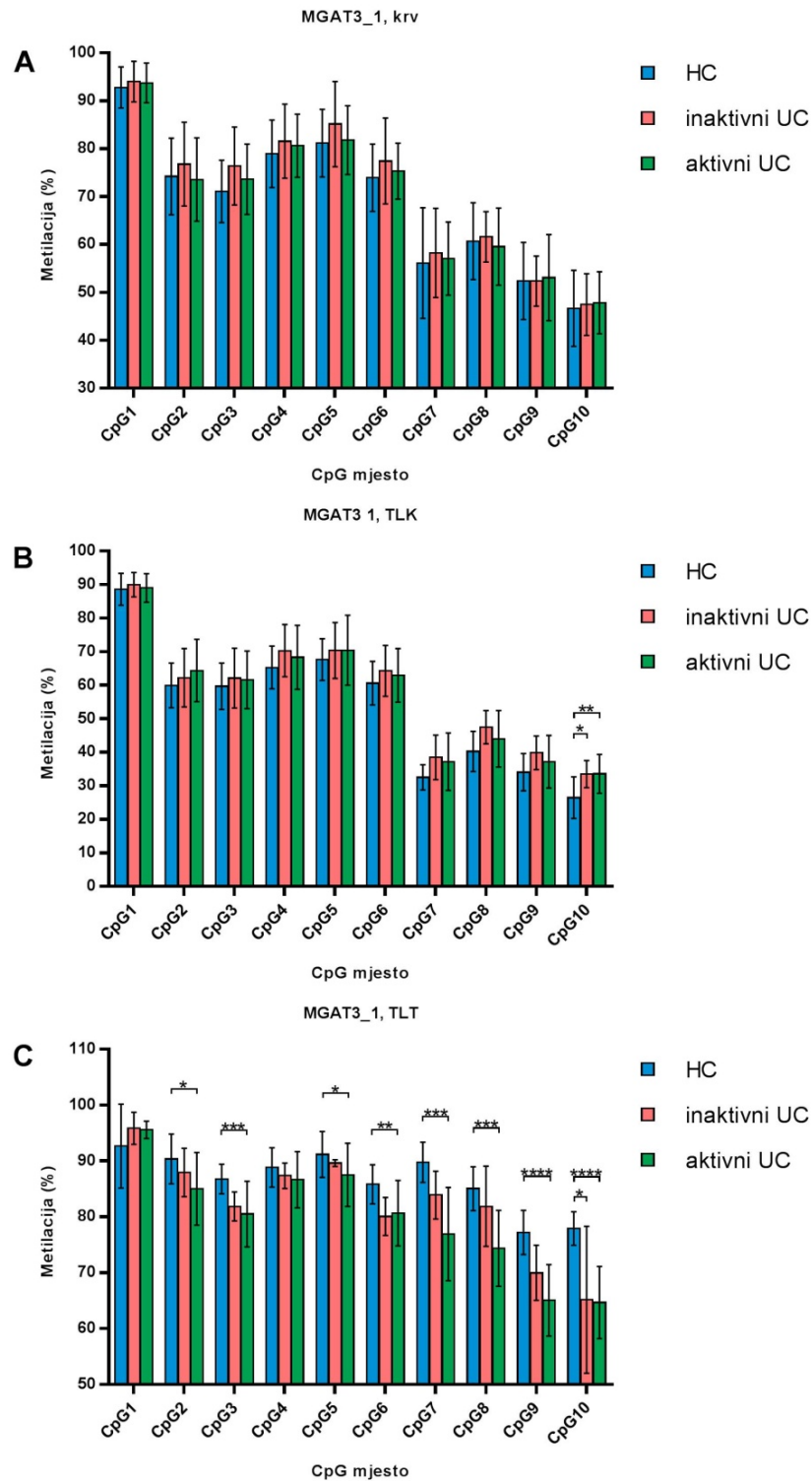
##### 4.3.1. Analiza metilacije gena *MGAT3*

Stupanj CpG metilacije pomoću metilacijskog testa 1 gena *MGAT3* analiziran je na ukupno 27 uzoraka DNA izoliranih iz stanica krvi pacijenata s UC-om i kontrolnih ispitanika (9 HC, 5 inaktivni UC, 13 aktivni UC, Tablica 1). Obrazac metilacije je sličan onome koji je dobiven analizom DNA iz krvi uzoraka kohorti Edinburgh i Firenza jer se vrijednosti metilacije mijenjaju na sličan način između pojedinih CpG mjesta. Stupanj metilacije fragmenta 1 kretao se između 46% i 94%. Nisu zabilježene razlike u stupnju CpG metilacije između pacijenata s UC-om i kontrolnih ispitanika, kao niti između aktivnog i inaktivnog oblika bolesti (Slika 17A).

Stupanj CpG metilacije fragmenta 1 gena *MGAT3* analiziran je na uzorcima T-limfocita iz krvi (11 HC, 5 inaktivni UC, 18 aktivni UC, Tablica 1). Obrazac metilacije bio je

sličan obrascu metilacije iz stanica krvi, no stupanj metilacije je bio niži u T-limfocitima za svako analizirano CpG mjesto i kretao se od 26% do 90%. Samo jedno CpG mjesto (CpG10) pokazalo je značajnu razliku (7.03%) između inaktivnog oblika bolesti u odnosu na kontrolne ispitanike, te je promjena išla u smjeru hipermetilacije. Isto CpG mjesto (CpG10) je pokazalo značajnu razliku (7.13%) u vidu hipermetilacije između aktivnog oblika UC-a u odnosu na HC. Nisu zabilježene razlike u stupnju CpG metilacije između aktivnog i inaktivnog oblika bolesti (Slika 17B).

Analiziran je stupanj metilacije fragmenta 1 gena *MGAT3* na uzorcima T-limfocita iz tkiva crijeva s mjesta upale (10 HC, 3 inaktivni UC, 18 aktivni UC, Tablica 1). Stupanj CpG metilacije T-limfocita iz tkiva bile su visoke- između 64% i 96%. U aktivnom obliku UC-a zabilježena je značajna hipometilacija u odnosu na HC za osam od ukupno deset analiziranih CpG mjesta s najznačajnijom razlikom za mjesto CpG10 (13.24%). U inaktivnom obliku bolesti značajna razlika stupnja metilacije u odnosu na kontrolne ispitanike zabilježena je samo za jedno CpG mjesto (CpG10), a iznosi 12.74%. Statistički test nije pokazao značajne razlike između inaktivnog i aktivnog oblika bolesti (Slika 17C).

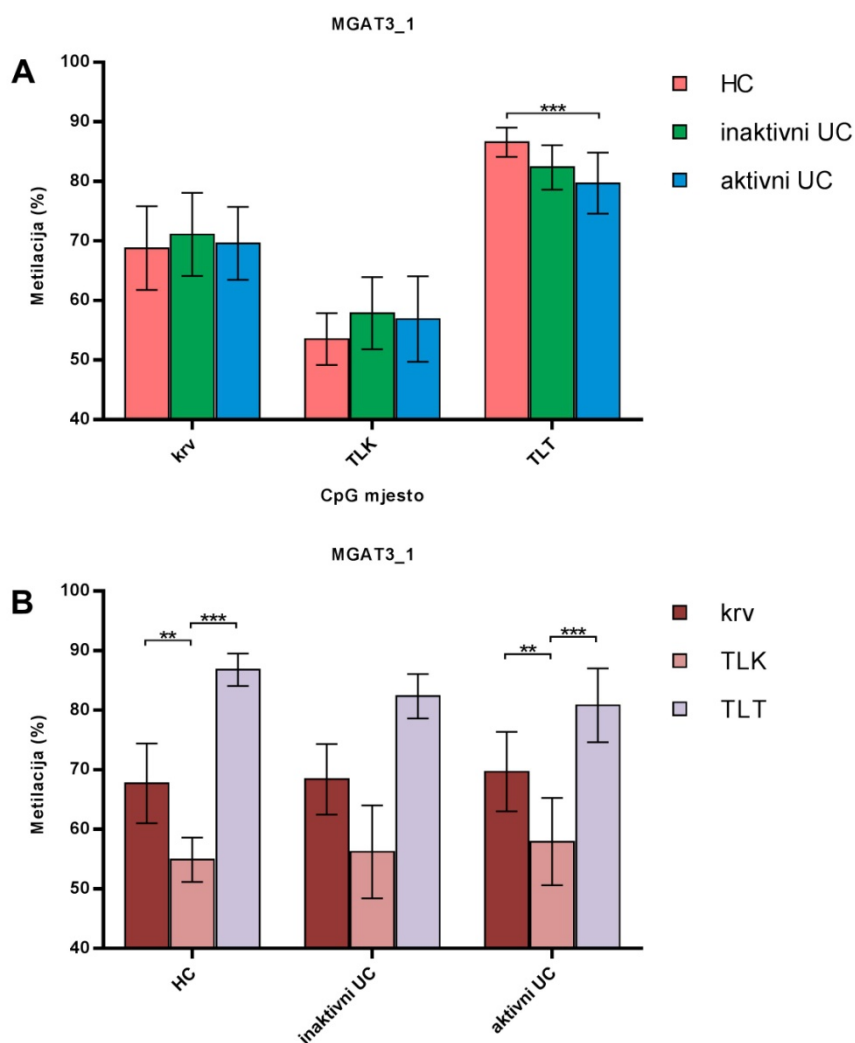


**Slika 17. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 1 gena *MGAT3*.** Prikazan je stupanj metilacije na deset CpG mjesta. Za analizu metilacije korištena je DNA iz stanica krvi (**A**), T-limfocita iz krvi (**B**) te iz T-limfocita iz tkiva crijeva s mjesta upale (**C**) pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Pacijenti su podijeljeni prema stadiju bolesti na inaktivni i aktivni UC. Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).



Na Slici 18A dan je prikaz srednjih vrijednosti stupnja metilacije svih analiziranih CpG mjesta fragmenta 1 gena *MGAT3* za tri različita izvora DNA (DNA iz stanica krvi, DNA iz T-limfocita iz krvi i DNA iz T-limfocita iz tkiva crijeva) te za sve skupine (HC, inaktivni i aktivni UC). Na ovom prikazu se može primijetiti da je stupanj metilacije u T-limfocitima iz krvi niži u odnosu na stupanj metilacije u T-limfocitima iz tkiva crijeva s upalom, a također i niži u odnosu na stupanj metilacije različitih staničnih tipova iz krvi.

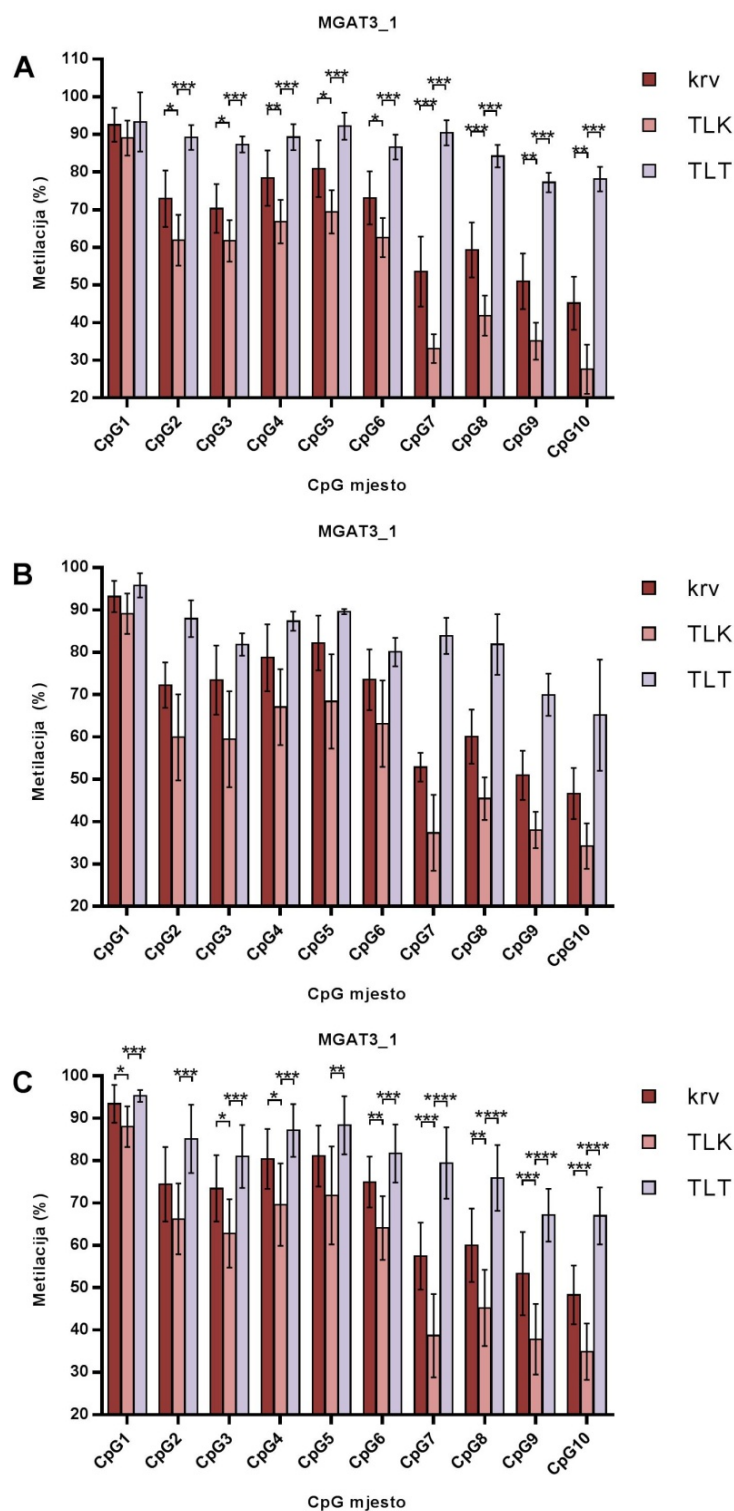
Na Slici 18B dan je prikaz srednjih vrijednosti stupnja metilacije istih CpG mjesta fragmenta 1 gena *MGAT3* analiziranih na DNA iz različitih izvora (stanice krvi, T-limfociti iz krvi i T-limfociti iz tkiva crijeva) za tri različite skupine (HC, inaktivni i aktivni UC). Analizirana je metilacija istih pacijenata, odnosno kontroli za usporedbu različitih izvora DNA (8 HC, 3 inaktivni UC, 11 aktivni UC). U pacijenata s inaktivnim oblikom UC-a, stupanj metilacije fragmenta 1 gena *MGAT3* nije se značajno razlikovao između različitih izvora DNA, dok je u pacijenata s aktivnim oblikom UC-a te u kontrolnim ispitanicima stupanj metilacije bio značajno različit između obje ispitivane skupine; između stanica krvi i T-limfocita iz krvi te između T-limfocita iz krvi i tkiva.



**Slika 18. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 1 gena *MGAT3*.** Za analizu metilacije korištena je DNA iz stanica krvi (krv), T-limfocita iz krvi (TLK) i tkiva crijeva (TLT) s mjesta upale pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Pacijenti su podijeljeni prema stadiju bolesti na inaktivni i aktivni UC. Prikazana je aritmetička sredina metilacije 10 CpG mjesta te standardne devijacije za svaku ispitanu skupinu. Uspoređena je metilacija između HC i UC te skupina UC međusobno (**A**), krvi i TLK te TLK i TLT (**B**). Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

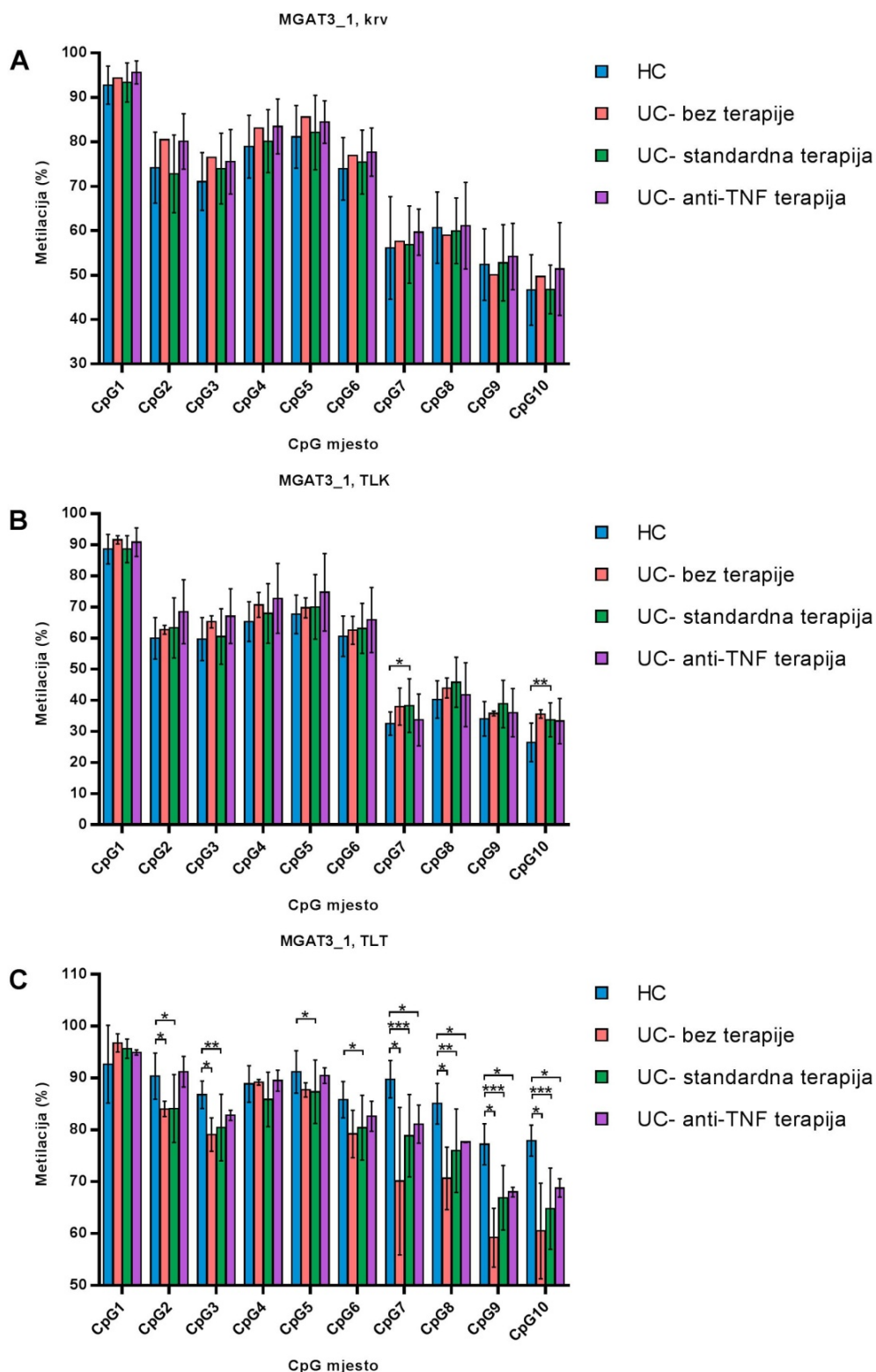
Na Slici 19 dan je prikaz stupnja metilacije za svako pojedinačno CpG mjesto istih pacijenata i kontrolnih ispitanika prikazanih na Slici 18B. U kontrolnih ispitanika, najniži stupanj metilacije pokazuje DNA iz T-limfocita iz krvi, a najviši stupanj metilacije prisutan je u DNA iz T-limfocita iz tkiva (Slika 19A). Sva CpG mjesta u kontrolnih ispitanika, osim CpG1, pokazuju značajne razlike između ispitivanih skupina (između stanica krvi i T-limfocita iz krvi te između T-limfocita iz krvi i iz tkiva). Razlika u metilaciji između stanica krvi i T-limfocita iz krvi najznačajnija je za mjesta CpG7 i CpG8 s razlikama od 20.5% i 17.44%. Razlika u metilaciji između T-limfocita iz krvi i tkiva pokazala se jednako značajnom za sva CpG mjesta (osim mjesta CpG1) s najvećom razlikom od 57.35% vidljivom za mjesto CpG7.

Na Slici 19B i C prikazan je stupanj metilacije za svako CpG mjesto u fragmentu 1 gena *MGAT3* u pacijenata s inaktivnim i aktivnim oblikom UC-a te je uočen isti obrazac metilacije kao i u kontrolnih ispitanika. Najnižu razinu metilacije pokazuju T-limfociti iz krvi, a najvišu T-limfociti iz tkiva. Statističkim testom nisu utvrđene značajne razlike u inaktivnom obliku UC-a između različitih izvora DNA (stanica krvi i T-limfocita iz krvi te između T-limfocita iz krvi i iz tkiva) (Slika 19B). Stupanj metilacije fragmenta 1 u aktivnom obliku UC-a razlikuje se za devet CpG mjesta između stanica krvi i T-limfocita iz krvi (najznačajniju razliku od 18.79% pokazuje mjesto CpG7). Stupanj metilacije svih CpG mjesta fragmenta 1 se značajno razlikuje između T-limfocita iz krvi i T-limfocita iz tkiva. Najznačajniji rezultat pokazuju mjesta CpG8 i CpG10 s razlikama od 30.69% i 32.06% (Slika 19C).



**Slika 19. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 1 gena *MGAT3*.** Prikazan je stupanj metilacije na deset CpG mjesta. Za analizu metilacije korištena je DNA iz stanica krvi (krv), T-limfocita iz krvi (TLK) i tkiva crijeva (TLT) s mjesta upale pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Uspoređena je metilacija između krvi i TLK te TLK i TLT za HC (**A**), inaktivni UC (**B**) i aktivni UC (**C**). Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Na Slici 20 je prikazana usporedba metilacije fragmenta 1 gena *MGAT3* između kontrolnih ispitanika i pacijenata koji su podijeljeni s obzirom na terapiju. Stupanj metilacije gena *MGAT3* analiziran u stanicama krvi nije bio značajno promijenjen u pacijentima u odnosu na kontrolne ispitanike, niti je bilo značajne razlike između skupina pacijenata. U analizu je bilo uključeno devet kontrolnih ispitanika, jedan pacijent bez terapije, 14 pacijenata sa standardnom terapijom i tri pacijenta s anti-TNF terapijom (Slika 20A). Stupanj metilacije na mjestima CpG7 i CpG10 fragmenta 1 analiziranog na DNA iz T-limfocita iz krvi bio je značajno promijenjen (hipermetilacija) između pacijenata koji su primili standardnu terapiju i kontrolnih ispitanika. Analizirana je metilacija 11 kontrolnih ispitanika, 2 pacijenta bez terapije, 17 pacijenata sa standardnom terapijom i 3 pacijenta s anti-TNF terapijom (Slika 20B). Kada je stupanj metilacije za fragment 1 analiziran na DNA iz T-limfocita iz tkiva crijeva s upalom, zabilježene su značajne razlike za sve skupine pacijenata (s obzirom na terapiju) u odnosu na kontrolne ispitanike (10 HC, 2 UC bez terapije, 17 UC sa standardnom terapijom, 3 UC s anti-TNF terapijom). U pacijenata koji nisu primili terapiju i u onih koji su primili standardnu terapiju metilacija je bila značajno smanjena na većini CpG mjesta fragmenta 1. U pacijenata koji su primili anti-TNF terapiju metilacija je bila značajno promijenjena za četiri zadnja CpG mjesta u fragmentu 1. Treba naglasiti da je stupanj metilacije na ovim mjestima značajno smanjen u svim skupinama pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike. Razlike u stupnju CpG metilacije za fragment 1 gena *MGAT3* nisu bile značajne između skupina pacijenata s različitom terapijom (Slika 20C).

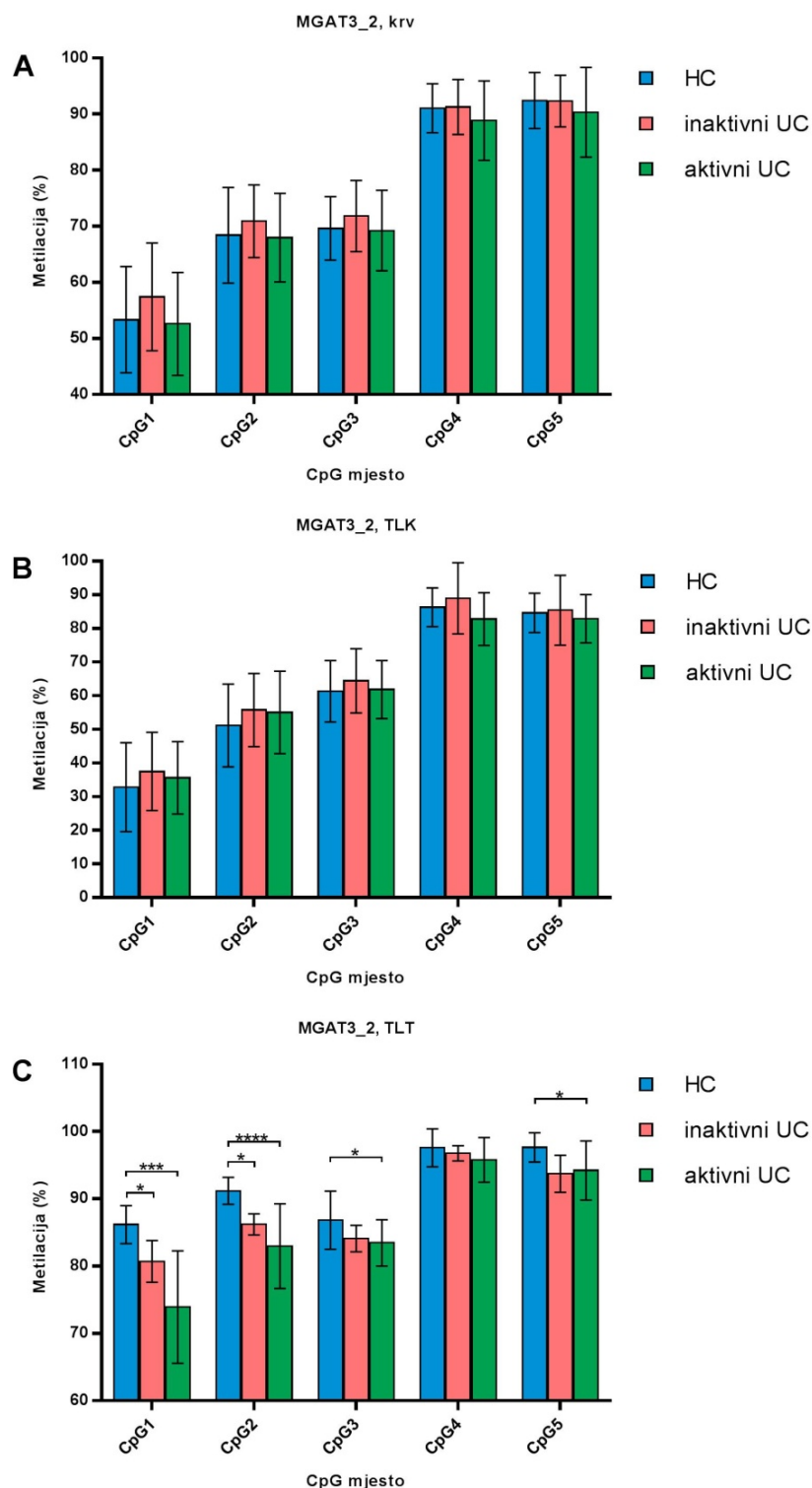


**Slika 20. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 1 gena *MGAT3*.** Prikazan je stupanj metilacije na deset CpG mjesta. Za analizu metilacije korištena je DNA iz stanica krvi (**A**), T-limfocita iz krvi (**B**) i tkiva crijeva (**C**) s mjesta upale pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Pacijenti su podijeljeni s obzirom na primljenu terapiju. Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

Metilacija fragmenta 2 gena *MGAT3* je analizirana na ukupno 28 uzoraka DNA izoliranih iz stanica krvi pacijenata s UC-om i kontrolnih ispitanika (10 HC, 5 inaktivni UC, 13 aktivni UC). Stupanj metilacije ovog fragmenta varirao je između 52% i 93%. Dok je u kohortama Edinburgh i Firenza uočena hipermetilacija u UC-u u odnosu na HC za sva analizirana CpG mjesta, u kohorti Porto hipermetilirana su bila prva četiri CpG mjesta u inaktivnom obliku UC-a, dok je u aktivnom obliku bolesti uočena hipometilacija za sva CpG mjesta fragmenta 2. Ipak, razlike u stupnju metilacije nisu bile značajne između pacijenata i kontrolnih ispitanika, kao niti između aktivnog i inaktivnog oblika bolesti (Slika 21A).

Iako je stupanj metilacije DNA iz T-limfocita iz krvi (11 HC, 5 inaktivni UC, 18 aktivni UC) bio niži na svim CpG mjestima (između 32% do 89%) u odnosu na stanice krvi, obrazac metilacije bio je sličan obrascu metilacije DNA iz stanica krvi. Razlike u stupnju metilacije nisu bile značajne između oba oblika UC-a i HC-a, niti između aktivnog i inaktivnog oblika bolesti (Slika 21B).

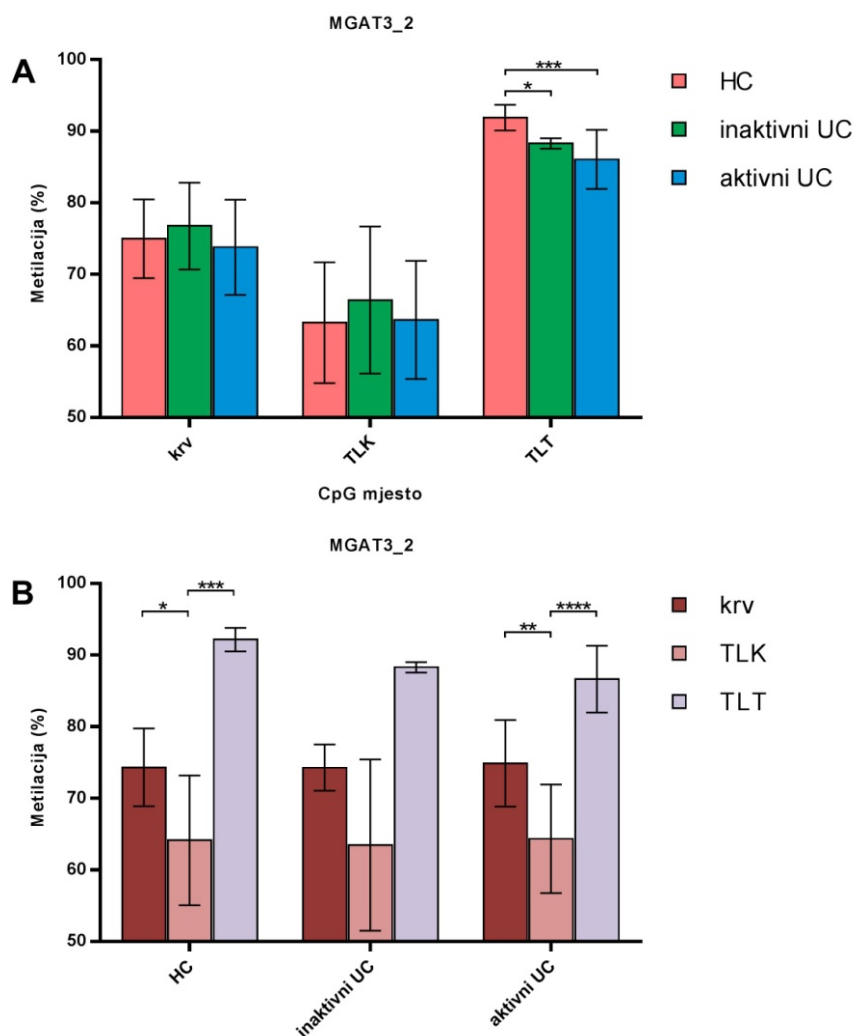
Stupanj metilacije DNA iz T-limfocita iz tkiva bio je znatno viši (između 73% i 98%) u odnosu na stupanj metilacije DNA iz T-limfocita iz krvi. Analiziran je 31 uzorak (10 HC, 3 inaktivni UC, 18 aktivni UC). U inaktivnom obliku UC-a stupanj metilacije značajno je smanjen na prva dva CpG mjesta (razlike iznose 5.48% i 4.99%), dok je u aktivnom obliku UC-a stupanj metilacije značajno promijenjen na četiri CpG mjesta (najznačajnija razlika iznosi 8.22% za mjesto CpG2). Nije uočena značajna razlika između stupnja metilacije fragmenta 2 u inaktivnom i aktivnom oblika bolesti (Slika 21C).



**Slika 21. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 2 gena *MGAT3*.** Prikazan je stupanj metilacije na pet CpG mjesta. Za analizu metilacije korištena je DNA iz stanica krvi (**A**), T-limfocita iz krvi (**B**) te iz T-limfocita iz tkiva crijeva s mjesta upale (**C**) pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Pacijenti su podijeljeni prema stadiju bolesti na inaktivni i aktivni UC. Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).



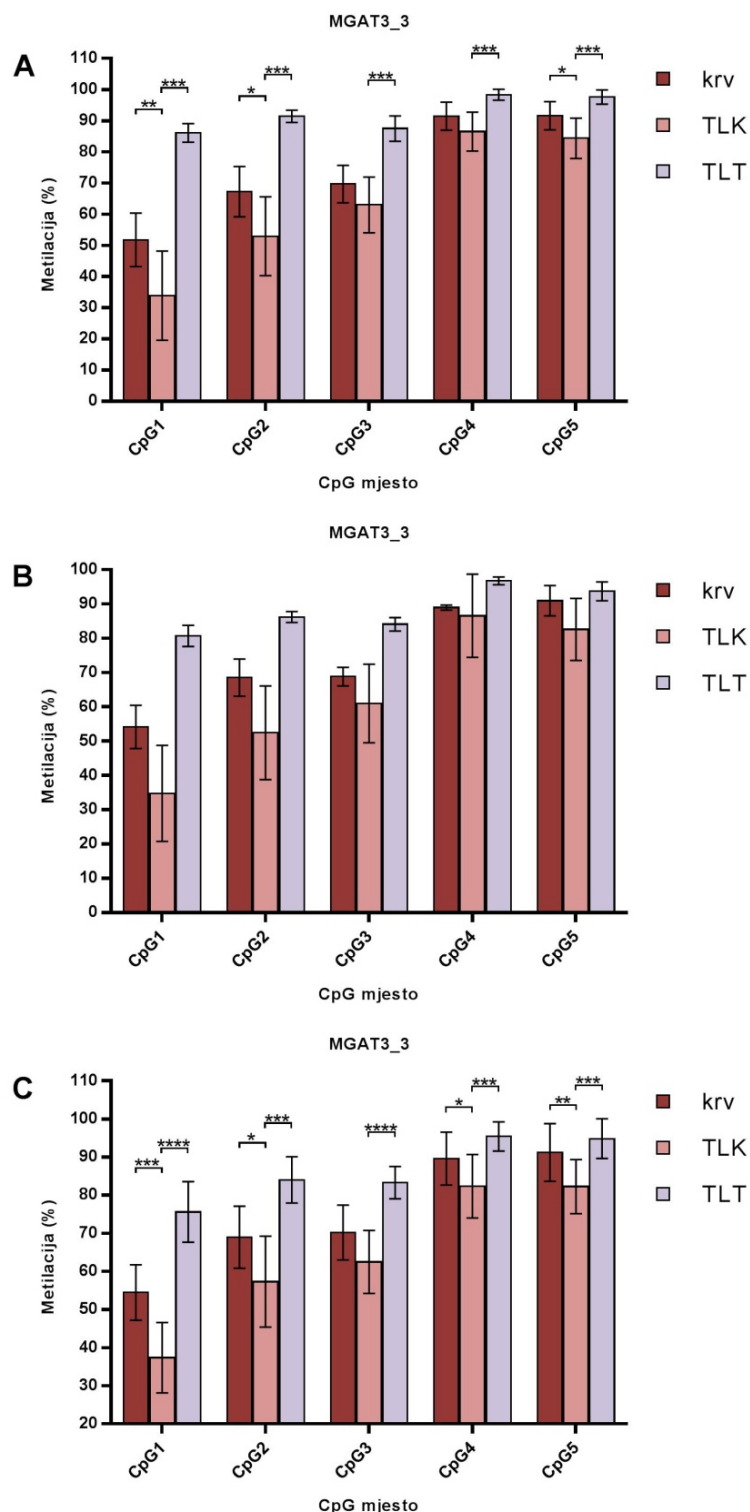
Srednja vrijednost stupnja metilacije CpG mjesta unutar fragmenta 2 (isto kao i u fragmentu 1) gena *MGAT3* je niži u DNA iz T-limfocita iz krvi nego u DNA iz stanica krvi i T-limfocita iz tkiva (Slika 22A). Na Slici 22B dan je prikaz srednje vrijednosti stupnja metilacije istih CpG mjesta fragmenta 2 analiziranih na DNA iz različitih izvora (stanice krvi, T-limfociti iz krvi i T-limfociti iz tkiva crijeva) za tri različite skupine (HC, inaktivni i aktivni UC). Analizirana je metilacija istih pacijenata, odnosno kontroli za usporedbu različitih izvora DNA (9 HC, 3 inaktivni UC, 11 aktivni UC). U pacijenata s inaktivnim oblikom UC-a, stupanj CpG metilacije fragmenta 2 nije se značajno razlikovao između različitih izvora iz kojih je izolirana DNA, dok je u pacijenata s aktivnim oblikom UC-a te u kontrolnim ispitanicima stupanj metilacije bio značajno različit između obje ispitivane skupine; između stanica krvi i T-limfocita iz krvi te između T-limfocita iz krvi i tkiva.



**Slika 22. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 2 gena *MGAT3*.** Za analizu metilacije korištena je DNA iz stanica krvi (krv), T-limfocita iz krvi (TLK) i tkiva crijeva (TLT) s mjesta upale pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Pacijenti su podijeljeni prema stadiju bolesti na inaktivni i aktivni UC. Prikazana je aritmetička sredina metilacije pet CpG mjesta te standardne devijacije za svaku ispitanu skupinu. Uspoređena je metilacija između HC i UC te skupina UC međusobno (**A**), krvi i TLK te TLK i TLT (**B**). Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

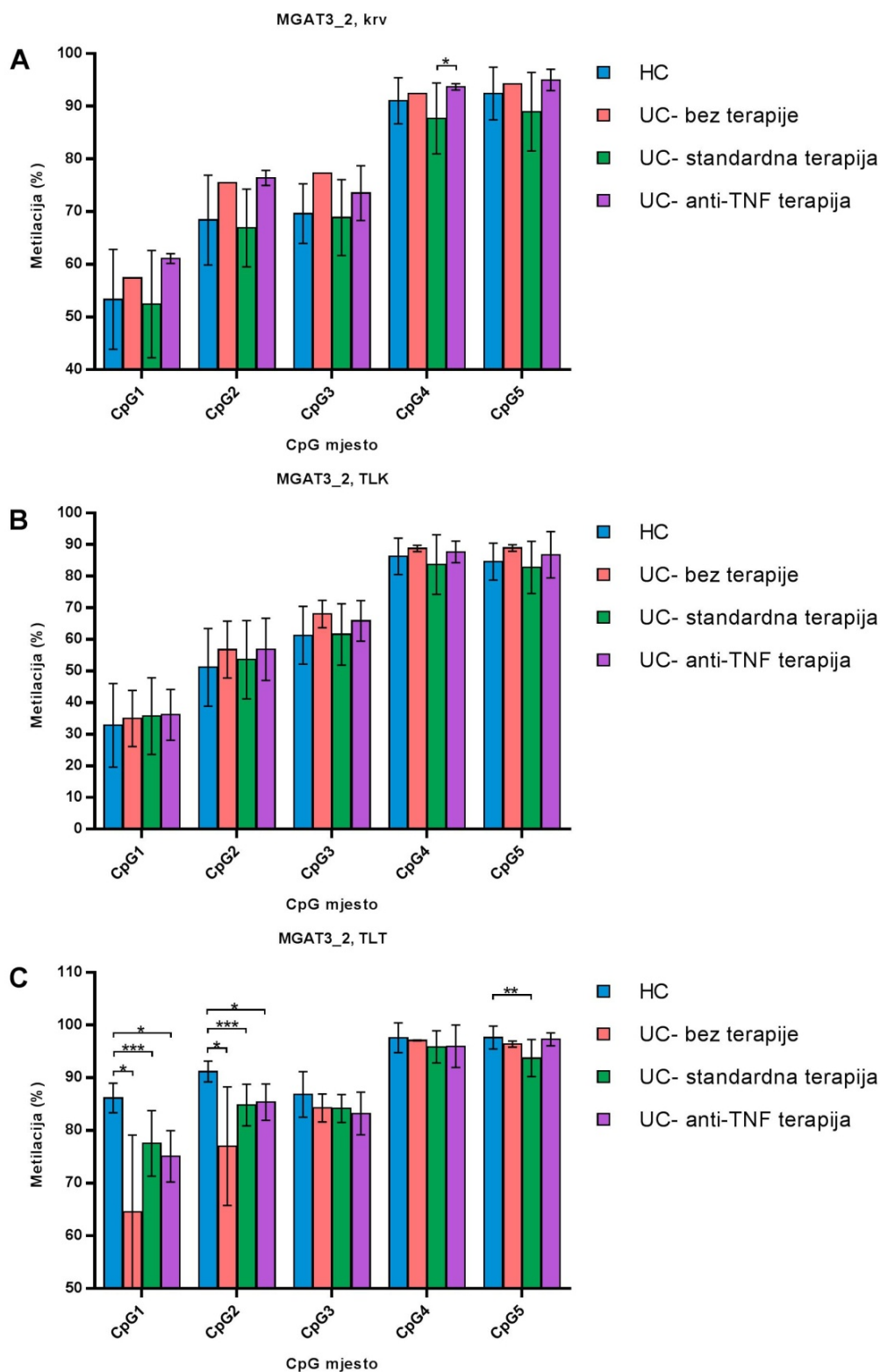
Na Slici 23 dan je prikaz stupnja metilacije za svako pojedinačno CpG mjesto fragmenta 2 gena *MGAT3* istih pacijenata i kontrolnih ispitanika prikazanih na Slici 22B. U oba oblika ulceroznog kolitisa i u kontrolnih ispitanika je vidljiva najniža metilacija u T-limfocitima iz krvi, a najviša u T-limfocitima iz tkiva za sva analizirana CpG mjesta. Kod kontrolnih ispitanika, tri CpG mjesta pokazuju značajne razlike između stanica krvi i T-limfocita iz krvi s najznačajnijom razlikom od 17.9% za mjesto CpG1. Sva CpG mjesta pokazuju značajne razlike između T-limfocita iz krvi i iz tkiva pri čemu mjesta CpG1 i CpG2 pokazuju najznačajnije razlike u metilaciji koje iznose 52.22% i 38.45% (Slika 23A).

Na Slici 23B i C prikazan je stupanj metilacije za svako CpG mjesto u fragmentu 2 gena *MGAT3* u pacijenata s inaktivnim i aktivnim oblikom UC-a te je uočen isti obrazac metilacije kao i u kontrolnih ispitanika. Statističkim testom nisu utvrđene značajne razlike u inaktivnom obliku UC-a između ispitivanih skupina (između stanica krvi i T-limfocita iz krvi te između T-limfocita iz krvi i iz tkiva) (Slika 23B). U aktivnom obliku UC-a je stupanj metilacije fragmenta 2 značajno niži u T-limfocitima iz krvi u odnosu na stanice krvi za četiri CpG mjesta s najznačajnijom razlikom od 17.09% (CpG1). Stupanj metilacije svih CpG mjesta fragmenta 2 se značajno razlikuje između T-limfocita iz krvi i T-limfocita iz tkiva. Jednako značajnu razliku pokazuju mjesta CpG1 (38.26%) i CpG3 (20.82%) (Slika 23C).



**Slika 23. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 2 gena *MGAT3*.** Prikazan je stupanj metilacije na pet CpG mjesta. Za analizu metilacije korištena je DNA iz stanica krvi (krv), T-limfocita iz krvi (TLK) i tkiva crijeva (TLT) s mjesta upale pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Uspoređena je metilacija između krvi i TLK te TLK i TLT za HC (**A**), inaktivni UC (**B**) i aktivni UC (**C**). Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Na Slici 24 prikazan je stupanj metilacije fragmenta 2 gena *MGAT3* za skupine pacijenata koji su podijeljeni s obzirom na terapiju. Samo je mjesto CpG4 imalo značajno promijenjen stupanj metilacije između pacijenata koji su primili standardnu terapiju i pacijenata koji su primili anti-TNF terapiju (metilacija analizirana na DNA iz krvi). U analizu je bilo uključeno deset kontrolnih ispitanika, jedan pacijent bez terapije, 13 pacijenata sa standardnom terapijom i tri pacijenta s anti-TNF terapijom (Slika 24A). Stupanj metilacije gena *MGAT3* analiziran iz T-limfocita iz krvi nije bio značajno promijenjen u pacijentima u odnosu na kontrolne ispitanike, niti je bilo značajne razlike između skupina pacijenata (11 HC, 2 UC bez terapije, 16 UC sa standardnom terapijom, 3 UC s anti-TNF terapijom) (Slika 24B). No, kada je CpG metilacija istog fragmenta 2 analizirana na DNA iz T-limfocita iz tkiva crijeva s upalom, zabilježene su značajne razlike za sve tri skupine pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike (10 HC, 2 UC bez terapije, 14 UC sa standardnom terapijom, 3 UC s anti-TNF terapijom). U svim trima ispitivanim skupinama pacijenata metilacija je bila značajno smanjena na prva dva CpG mjesta. Osim prva dva CpG mjesta, značajno smanjena metilacija je vidljiva i na mjestu CpG5 u pacijenata koji su primili standardnu terapiju. Razlike u stupnju CpG metilacije za fragment 2 gena *MGAT3* nisu bile značajne između skupina pacijenata s različitom terapijom (Slika 24C).



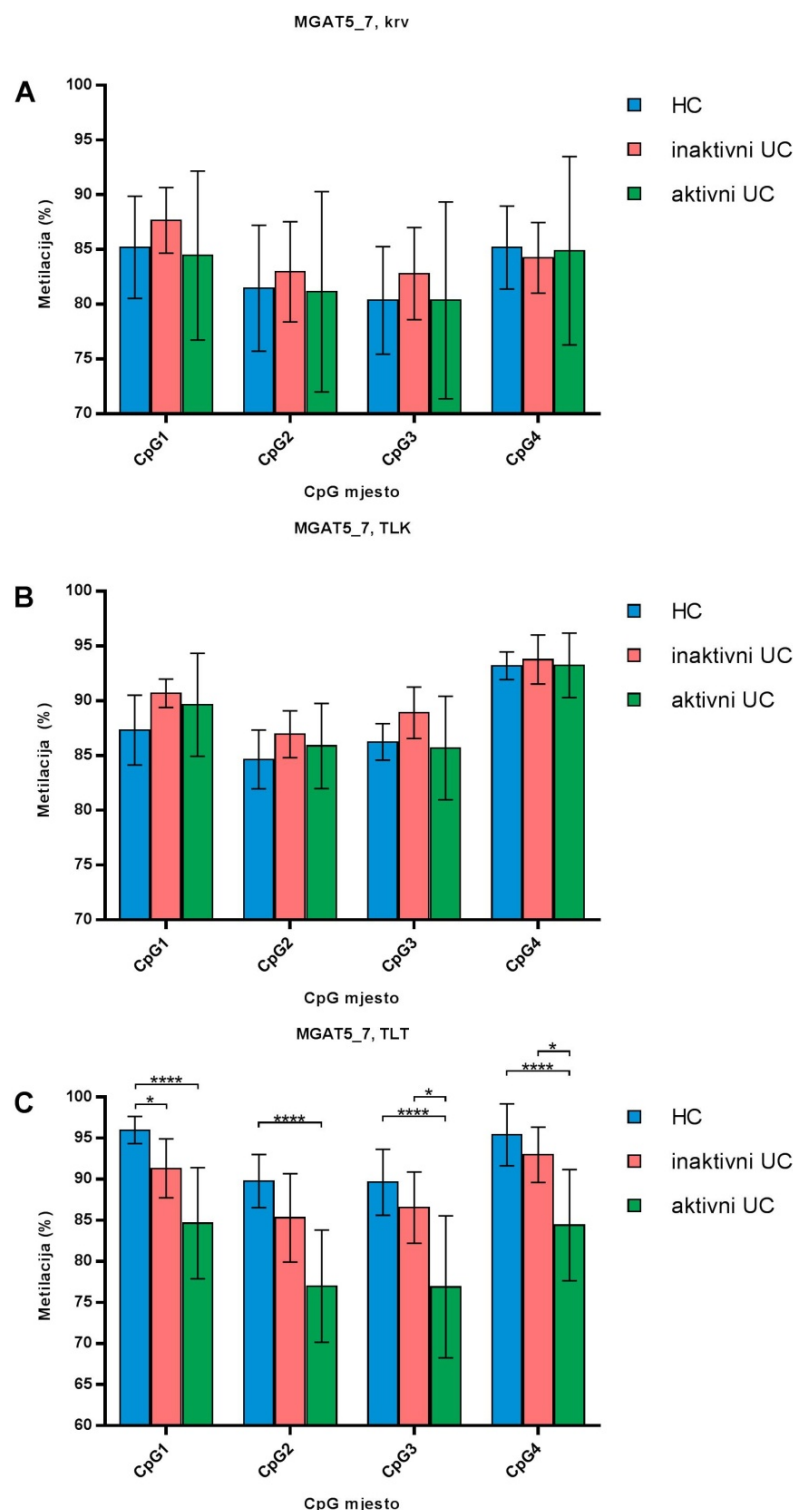
**Slika 24. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 2 gena *MGAT3*.** Prikazan je stupanj metilacije na pet CpG mjesta. Za analizu metilacije korištena je DNA iz stanica krvi (**A**), T-limfocita iz krvi (**B**) i tkiva crijeva (**C**) s mjesta upale pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Pacijenti su podijeljeni s obzirom na primljenu terapiju. Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### 4.3.2. Analiza metilacije gena *MGAT5*

Stupanj CpG metilacije fragmenta 7 gena *MGAT5* analiziran je na ukupno 29 uzoraka DNA izoliranih iz stanica krvi pacijenata s UC-om i kontrolnih ispitanika (10 HC, 5 inaktivni UC, 14 aktivni UC, Tablica 1). Obrazac metilacije je sličan onome koji je dobiven analizom DNA iz krvi uzoraka kohorti Edinburgh i Firenza jer se vrijednosti metilacije mijenjaju na sličan način između pojedinih CpG mjesta. No, stupanj metilacije u ovoj kohorti je malo niži te se kreće od 80% do 88%. Statističkim testom nisu utvrđene značajne razlike u stupnju CpG metilacije između pacijenata s UC-om i kontrolnih ispitanika, kao niti između aktivnog i inaktivnog oblika bolesti (Slika 25A).

U slučaju kada je metilacija fragmenta 7 analizirana na uzorcima T-limfocita iz krvi (11 HC, 5 inaktivni UC, 18 aktivni UC, Tablica 1), obrazac metilacije se razlikovao od onog iz stanica krvi te je stupanj metilacije bio viši za svako CpG mjesto (84%-94%). Nisu zabilježene razlike u stupnju CpG metilacije između inaktivnog i aktivnog oblika UC-a i HC-a, kao niti između inaktivnog i aktivnog oblika bolesti (Slika 25B).

U slučaju kada je metilacija fragmenta 7 gena *MGAT5* analizirana na uzorcima T-limfocita iz tkiva crijeva s mjesta upale (11 HC, 3 inaktivni UC, 18 aktivni UC, Tablica 1), obrazac CpG metilacije nije bio sličan obrascu metilacije u T-limfocitima iz krvi. Stupanj metilacije za sva CpG mjesta za sve skupine bio je visok (76%-96%). U inaktivnom obliku UC-a zabilježena je značajna hipometilacija u odnosu na HC samo za jedno CpG mjesto (CpG1) s razlikom od 4.67%, dok je u aktivnom obliku bolesti zabilježena za sva četiri CpG mjesta s najznačajnijom razlikom od 12.79% (CpG2). Zadnja dva CpG mjesta u fragmentu 7 pokazuju značajne razlike između inaktivnog i aktivnog oblika UC-a te iznose 9.64% i 8.56% (Slika 25C).

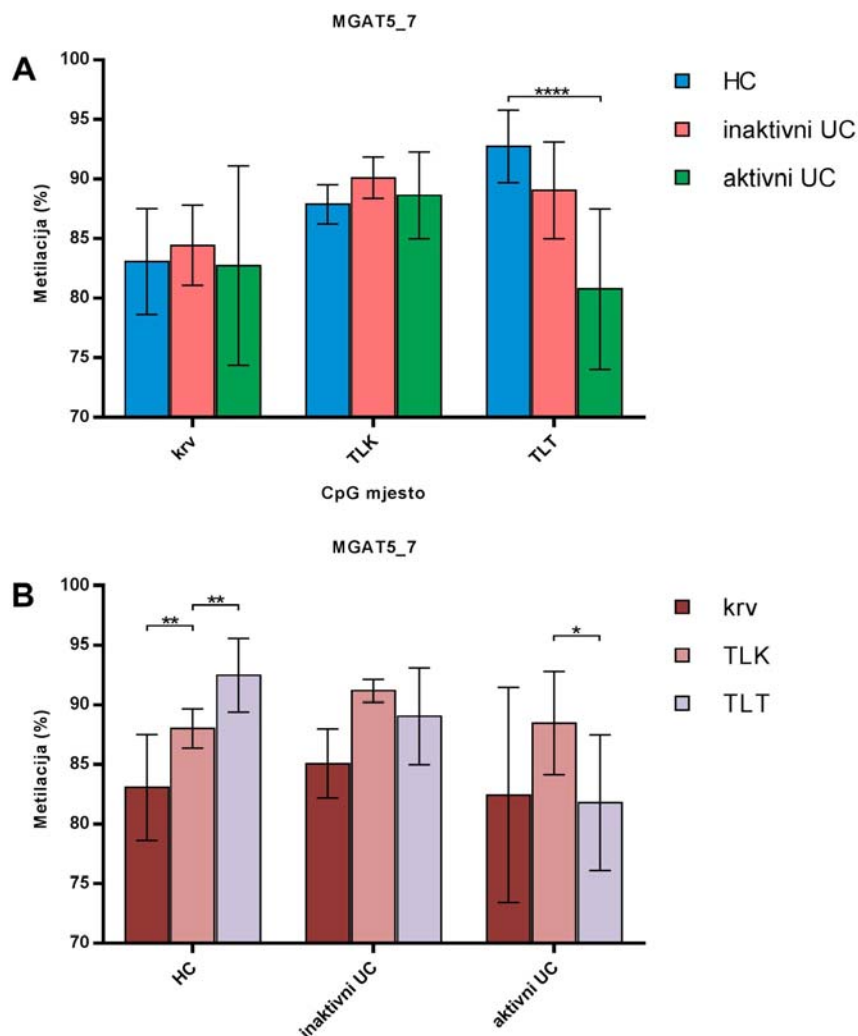


**Slika 25. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 7 gena *MGAT5*.** Prikazan je stupanj metilacije na četiri CpG mjesta. Za analizu metilacije korištena je DNA iz stanica krvi (**A**), T-limfocita iz krvi (**B**) te iz T-limfocita iz tkiva crijeva s mjesta upale (**C**) pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Pacijenti su podijeljeni prema stadiju bolesti na inaktivni i aktivni UC. Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.05$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).



Na Slici 26A dan je prikaz srednjih vrijednosti stupnja metilacije za sva četiri analizirana CpG mjesta fragmenta 7 gena *MGAT5* za tri različita izvora DNA te za sve skupine ispitanika (HC, inaktivni i aktivni UC). Na ovom prikazu se može primijetiti da je stupanj metilacije u T-limfocitima iz krvi viši u odnosu na stupanj metilacije različitih staničnih tipova iz krvi. Stupanj metilacije u T-limfocitima iz tkiva je viši u odnosu na T-limfocite iz krvi samo za kontrolne ispitanike, dok pacijenti pokazuju niži stupanj metilacije.

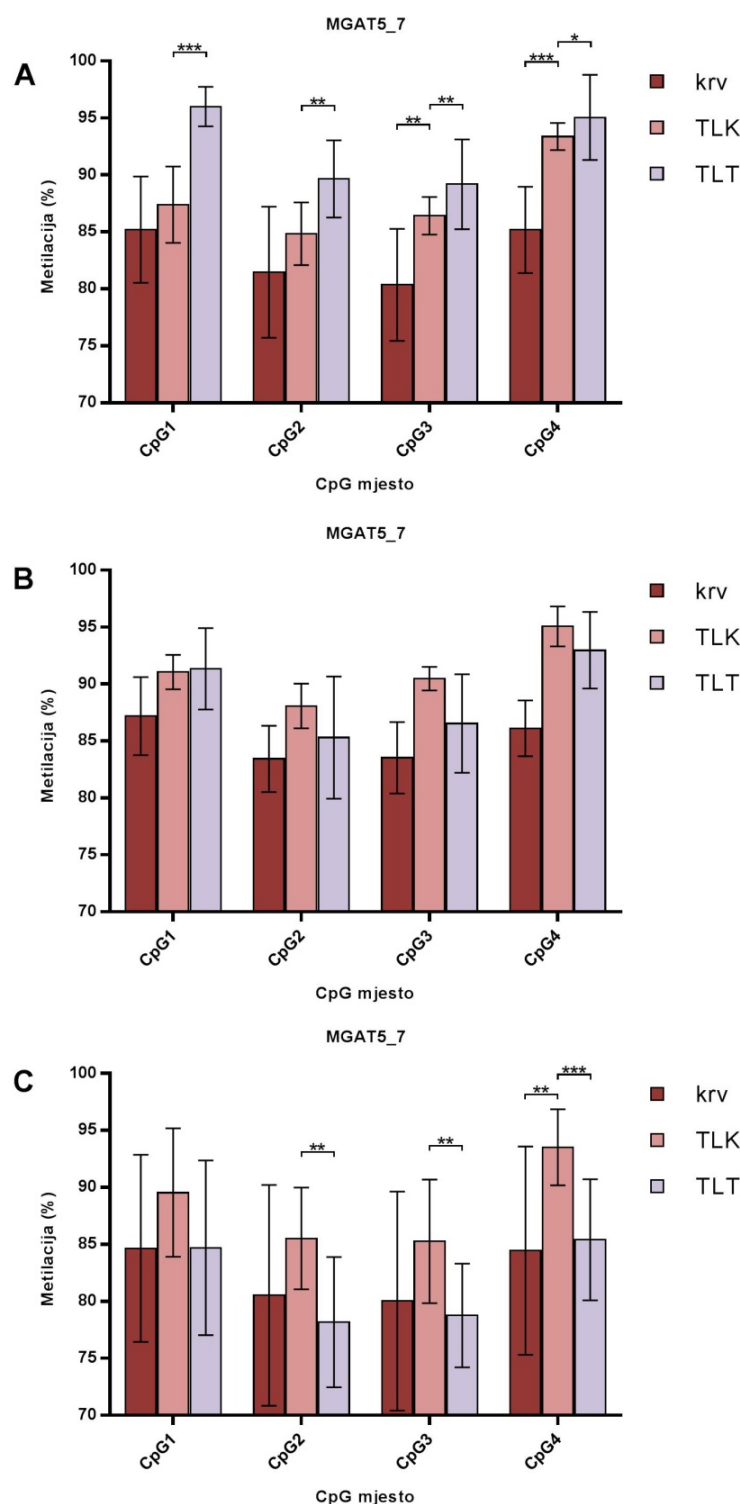
Na Slici 26B je prikazana srednja vrijednost stupnja metilacije svih CpG mjesta analiziranih na DNA iz različitih izvora za tri različite skupine ispitanika (HC, inaktivni i aktivni UC). U analizu su bile uključene iste jedinice (10 HC, 3 inaktivni UC, 12 aktivni UC) za usporedbu metilacije u DNA iz različitih izvora (stanice krvi, T-limfociti iz krvi i tkiva). U kontrolnih ispitanika, stupanj metilacije bio je značajno različit između obje ispitivane skupine; između stanica krvi i T-limfocita iz krvi te između T-limfocita iz krvi i tkiva. U pacijenata s aktivnim oblikom UC-a se stupanj metilacije značajno razlikovao samo između T-limfocita iz krvi i iz tkiva, a razlike u metilaciji za inaktivni oblik bolesti nisu bile značajne.



**Slika 26. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 7 gena *MGAT5*.** Za analizu metilacije korištena je DNA iz stanica krvi (krv), T-limfocita iz krvi (TLK) i tkiva crijeva (TLT) s mjesta upale pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Pacijenti su podijeljeni prema stadiju bolesti na inaktivni i aktivni UC. Prikazana je aritmetička sredina metilacije četiri CpG mjesta te standardne devijacije za svaku ispitanu skupinu. Uspoređena je metilacija između HC i UC te skupina UC međusobno (**A**), krvi i TLK te TLK i TLT (**B**). Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

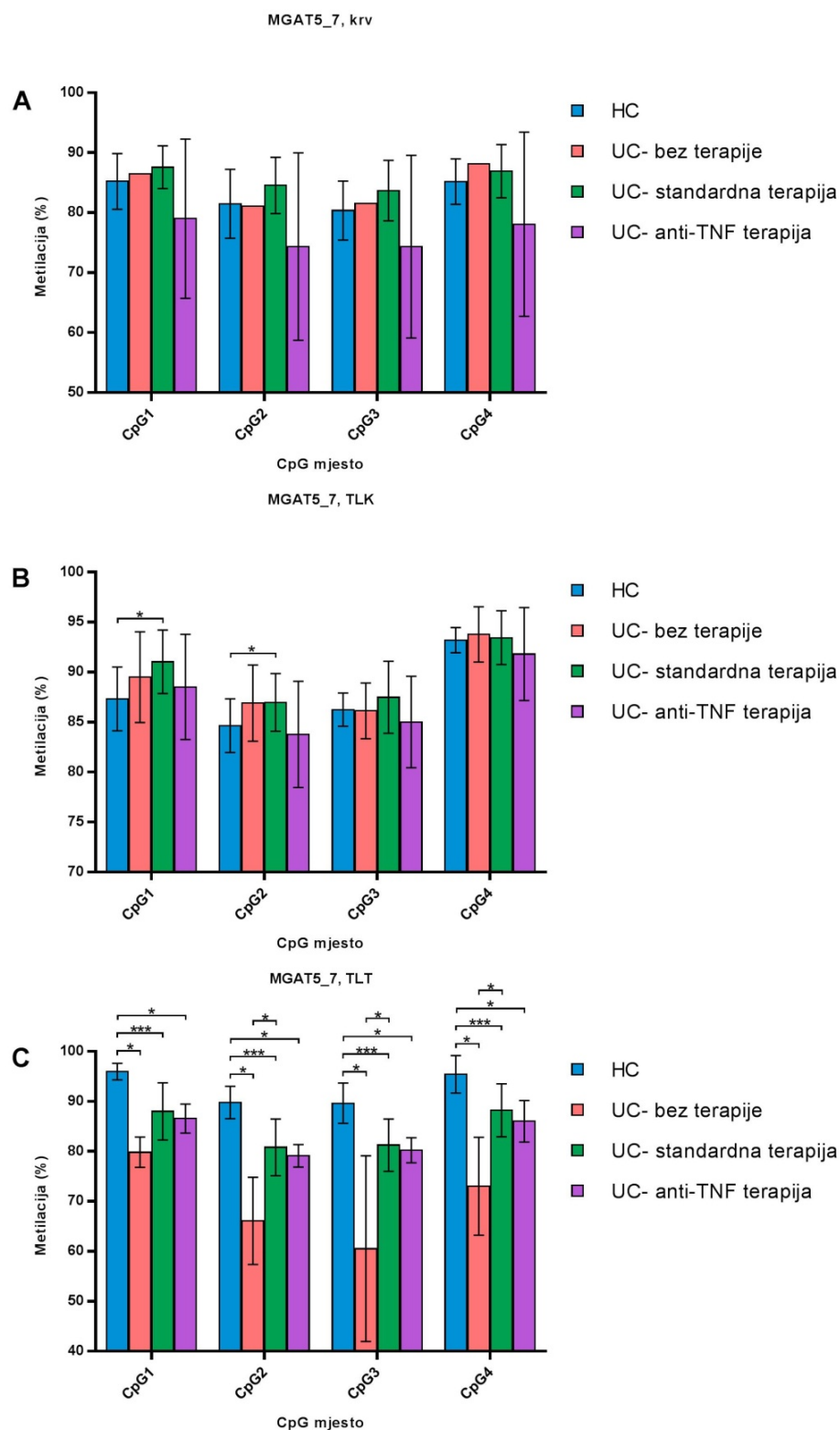
Na Slici 27 dan je prikaz stupnja metilacije za svako pojedinačno CpG mjesto fragmenta 7 gena *MGAT5* istih pacijenata i kontrolnih ispitanika prikazanih na Slici 26B. U kontrolnih ispitanika, najniži stupanj CpG metilacije dobiven je u DNA iz stanica krvi, a najviši stupanj metilacije prisutan je u DNA iz T-limfocita iz tkiva. Usporedbom metilacije između stanica krvi i T-limfocita iz krvi, T-limfociti pokazuju značajno veću metilaciju za dva CpG mjesta gdje je značajnija razlika iznosila 8.2% (CpG4). Nasuprot tome, T-limfociti iz krvi su pokazali značajno smanjenu metilaciju za sva CpG mjesta u odnosu na T-limfocite iz tkiva te je najznačajnija razlika iznosila 8.6% (CpG1) (Slika 27A).

Na Slici 27B i C prikazan je stupanj metilacije za svako CpG mjesto u fragmentu 7 u pacijenata s inaktivnim i aktivnim oblikom UC-a. U inaktivnom obliku UC-a nije zabilježena značajna razlika između različitih uzoraka DNA (Slika 27B). Stupanj metilacije u aktivnom obliku UC-a razlikuje se za tri CpG mjesta između T-limfocita iz krvi i tkiva s najznačajnijom razlikom od 8.12% (CpG4) te za jedno CpG mjesto (CpG4) između stanica krvi i T-limfocita iz krvi s razlikom od 9.07% (Slika 27C).



**Slika 27. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 7 gena *MGAT5*.** Prikazan je stupanj metilacije na četiri CpG mjesta. Za analizu metilacije korištena je DNA iz stanica krvi (krv), T-limfocita iz krvi (TLK) i tkiva crijeva (TLT) s mjesta upale pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Uspoređena je metilacija između krvi i TLK te TLK i TLT za HC (**A**), inaktivni UC (**B**) i aktivni UC (**C**). Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

Na Slici 28 je prikazana usporedba metilacije fragmenta 7 gena *MGAT5* između kontrolnih ispitanika i pacijenata koji su podijeljeni s obzirom na terapiju. Stupanj metilacije gena *MGAT5* analiziran u stanicama krvi nije bio značajno promijenjen u pacijentima u odnosu na kontrolne ispitanike, niti je bilo značajne razlike između skupina pacijenata. U analizu je bilo uključeno deset kontrolnih ispitanika, jedan pacijent bez terapije, 13 pacijenata sa standardnom terapijom i tri pacijenta s anti-TNF terapijom (Slika 28A). Stupanj metilacije na dva CpG mjesta (CpG1 i CpG2) fragmenta 7 analiziranog na DNA iz T-limfocita iz krvi bio je značajno promijenjen (hipermetilacija) između pacijenata koji su primili standardnu terapiju i kontrolnih ispitanika (11 HC, 2 UC bez terapije, 16 UC sa standardnom terapijom, 3 UC s anti-TNF terapijom) (Slika 28B). S druge strane, stupanj metilacije u DNA iz T-limfocita iz tkiva bio je značajno smanjen na svim analiziranim CpG mjestima u svim skupinama pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike (11 HC, 2 UC bez terapije, 14 UC sa standardnom terapijom, 3 UC s anti-TNF terapijom). Razlika u stupnju CpG metilacije između pacijenata koji su primili standardnu terapiju i onih koji je nisu primili je značajna za tri CpG mjesta s razlikom i do 20.71% (CpG3) (Slika 28C).

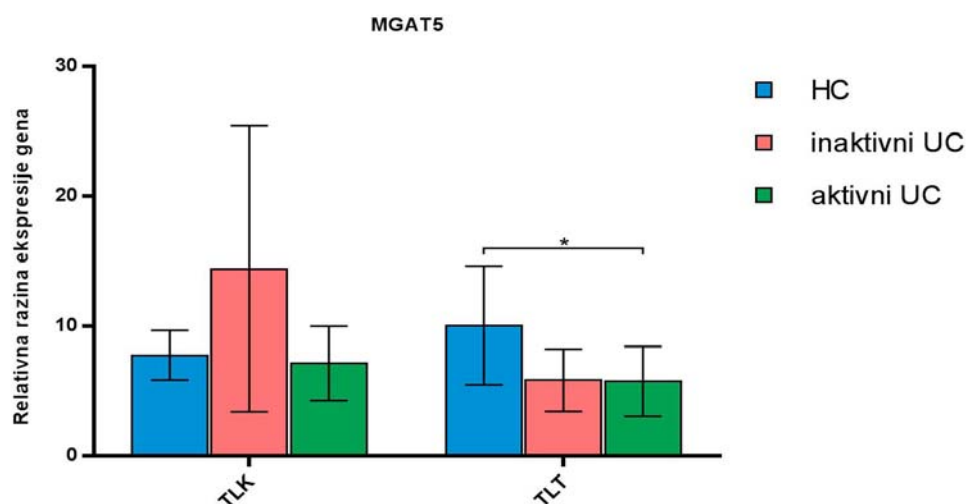


**Slika 28. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 7 gena *MGAT5*.** Prikazan je stupanj metilacije na četiri CpG mjesta. Za analizu metilacije korištena je DNA iz stanica krvi (**A**), T-limfocita iz krvi (**B**) i tkiva crijeva (**C**) s mjesta upale pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Pacijenti su podijeljeni s obzirom na primljenu terapiju. Prikazana je aritmetička sredina metilacije te standardne devijacije za svako CpG mjesto unutar istovjetne skupine. Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### 4.4. Analiza ekspresije gena *MGAT5* uzoraka iz kohorte Porto

Ekspresija gena *MGAT5* je analizirana na RNA izoliranoj iz T-limfocita u krvi i na RNA iz tkiva crijeva s mjesta upale pacijenata oboljelih od UC-a te kontrolnih ispitanika. U tu svrhu je korištena metoda kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu te je ekspresija gena kandidata normalizirana u odnosu na endogenu kontrolu *HMBS*. Pacijenti su podijeljeni prema stadiju bolesti na pacijente s inaktivnim i aktivnim oblikom ulceroznog kolitisa. Primjenjen je neparametrijski Mann-Whitney U test za usporedbu ekspresije gena kandidata između pojedinih skupina pacijenata i kontrolnih ispitanika te između skupina pacijenata međusobno. Vrijednosti s  $p < 0.05$  su smatrane statistički značajnima.

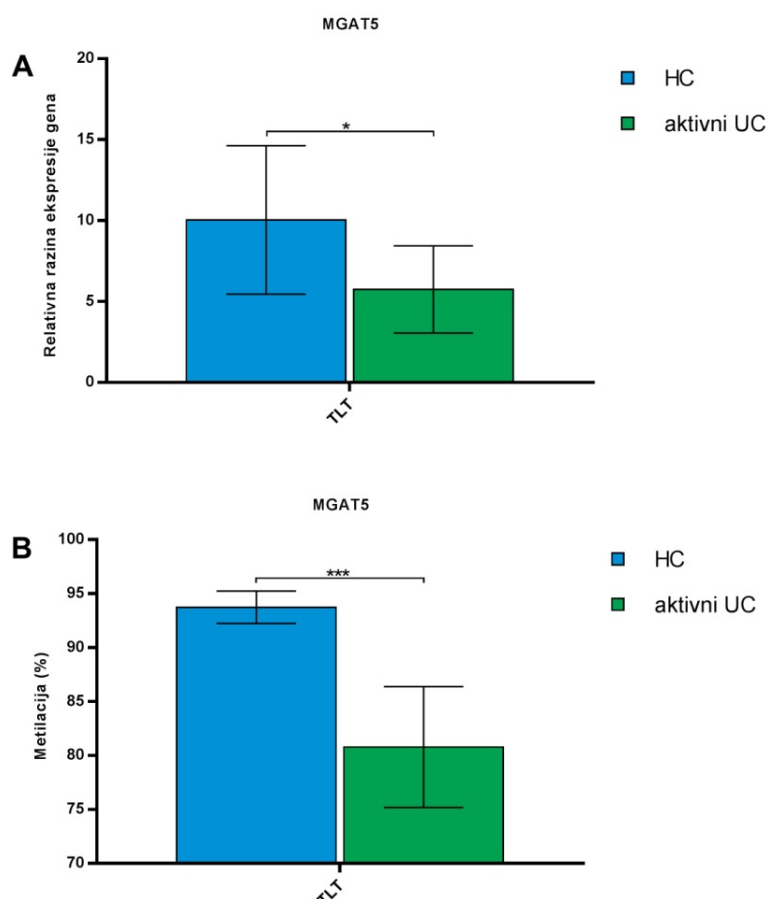
Ekspresija gena *MGAT5* analizirana na RNA iz T-limfocita u krvi nije bila značajno promijenjena između skupina pacijenata i kontrolnih ispitanika, kao niti između dva oblika UC-a. Ekspresija je analizirana za 11 kontrolnih ispitanika, četiri pacijenta s inaktivnim oblikom bolesti i 15 pacijenata s aktivnim oblikom bolesti. No, kada je analizirana na RNA izoliranoj iz T-limfocitima iz tkiva crijeva, ekspresija gena *MGAT5* pokazala se značajno smanjenom u aktivnom obliku UC-a u odnosu na kontrolne ispitanike gdje *MGAT5* ima 1.7 puta manju ekspresiju. Analizirano je 8 kontrolnih ispitanika, 5 pacijenata s inaktivnim UC-om i 13 pacijenata s aktivnim UC-om. Između inaktivnog i aktivnog oblika bolesti ekspresija gena *MGAT5* nije bila značajno promijenjena (Slika 29).



**Slika 29. Relativna razina ekspresije gena *MGAT5*.** Razina ekspresije je izmjerena korištenjem metode qPCR i normalizirana u odnosu na *HMBS*. Ekspresija je analizirana na cDNA iz T-limfocita iz krvi (TLK) i iz T-limfocita iz tkiva crijeva (TLT) s mjesta upale pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Pacijenti su podijeljeni prema stadiju bolesti na inaktivni i aktivni UC. Prikazana je aritmetička sredina ekspresije te standardne devijacije unutar istovjetne skupine. Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.05$ ).



Budući da je CpG metilacija jedan od načina regulacije ekspresije gena, napravljena je usporedba rezultata metilacije i ekspresije gena *MGAT5* (Slika 30). U slučaju T-limfocita iz tkiva (8 HC, 3 inaktivni UC, 13 aktivni UC), i promjena ekspresije (smanjenje 1.7 puta) i promjena CpG metilacije (smanjenje za 12.95%) bila je značajna u aktivnom obliku UC-a u odnosu na HC.



**Slika 30. Stupanj CpG metilacije unutar fragmenta 7 i relativna razina ekspresije gena *MGAT5*.** Bisulfitnim pirosekvenciranjem kvantificirana je metilacija 4 CpG mjesta. Razina ekspresije je izmjerena korištenjem metode qPCR i normalizirana u odnosu na *HMBS*. Za analizu metilacije i ekspresije korištena je DNA/cDNA iz T-limfocita iz tkiva crijeva (TLT) s mjesta upale pacijenata koji boluju od aktivnog oblika ulceroznog kolitisa (UC) te kontrolnih ispitanika (HC). Prikazana je aritmetička sredina metilacije svih CpG mjesta i ekspresije te standardne devijacije unutar istovjetne skupine. Skupine su međusobno uspoređene Mann-Whitney U testom (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

## 5. RASPRAVA

Geni *MGAT3* i *MGAT5* kodiraju za enzime uključene direktno u proces *N*-glikozilacije proteina. Gen *MGAT3* kodira za N-acetilglukozaminiltransferazu III (GnT-III) koji prenosi N-acetilglukozamin (GlcNAc) na  $\beta$ 1,4-vezanu manozu u srži od tri manoze *N*-glikana te pri tome proizvodi rasijecajući GlcNAc. Gen *MGAT5* kodira za enzim N-acetilglukozaminiltransferazu V (GnT-V) koji prenosi N-acetilglukozamin (GlcNAc) na  $\beta$ 1,6-vezanu manozu u srži od tri manoze *N*-glikana pri čemu nastaje razgranata struktura *N*-glikana. Rasijecajući GlcNAc nije supstrat za ostale glikoziltransferaze poput GnT-V pa njegov dodatak rezultira supresijom daljnjeg procesiranja i elongacije *N*-glikana (Miwa i sur., 2012.). GWA studija *N*-glikoma IgG-a povezala je gen *MGAT3* s glikozilacijom IgG-a (Lauc i sur., 2013.), a prethodno je ovaj gen povezan i s Crohnovom bolesti (Franke i sur., 2010.) što ukazuje da bi glikozilacija IgG-a mogla biti uključena u patologiju IBD-a. Također, u pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa je primjećena smanjena razina mRNA gena *MGAT5* kao i produkta djelovanja glikoziltransferaze kodirane ovim genom-  $\beta$ 1,6-razgranatih *N*-glikana na receptorima T-limfocita u tkivu crijeva (Dias i sur., 2014.).

Trbojević Akmačić i sur. (2015.) su proveli dosad najveće istraživanje *N*-glikana IgG-a u IBD-u koje je uključilo 1114 pacijenata s IBD-em i zdravih osoba. Pokazali su da su monogalaktozilirane glikoforme IgG-a značajno manje zastupljene u pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa, a digalaktozilirane glikoforme samo u pacijenata s Crohnovom bolesti. Također je pokazano da su sijalinizirane glikoforme također značajno manje zastupljene u pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti. Od prije je poznato da IgG može mijenjati funkciju (iz proupalne u protuupalnu) ovisno o njenoj glikozilaciji na Fc regiji, te da protuupalnoj funkciji pridonosi galaktoza i terminalno vezana sijalinska kiselina (Böhm i sur., 2014.; Kaneko i sur., 2006.; Karsten i sur., 2012.). Smanjeni udio galaktoziliranih i sijaliniziranih glikoformi IgG-a koje su Trbojević Akmačić i sur. (2015.) zabilježili u pacijenata s IBD-em ukazuje na to da IgG ima proupalnu funkciju u upalnim bolestima crijeva. Kako je sijalinizacija, barem dijelom, ovisna o galaktozilaciji, moguće je da je smanjena sijalinizacija posljedica smanjene galaktozilacije IgG-a. U pacijenata s Crohnovom bolesti primjećen je značajan porast glikoformi koje sadrže rasijecajući GlcNAc (Trbojević Akmačić i sur., 2015.), kojeg dodaje glikoziltransferaza GnT-III. Rasijecajući GlcNAc-a mijenja sastav i konformaciju *N*-glikana na koji je vezan (Kizuka i Taniguchi, 2016.; Miwa i sur., 2012.), međutim njegov utjecaj na funkciju IgG-a još uvijek nije u potpunosti razjašnjen.

Istraživanje glikoma IgG-a (Trbojević Akmačić i sur., 2015.) i istraživanje metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* u IBD-u provedeno u okviru ove doktorske disertacije dio je zajedničkog projekta FP7 „*Diagnostic and prognostic biomarkers for inflammatory bowel disease*“ (*IBD-BIOM*). Postavljena je hipoteza da je promjena glikozilacije IgG-a u krvi pacijenata s IBD-em povezana s promjenom metilacije gena *MGAT3* koji je GWA studijama povezan s glikozilacijom IgG-a (Lauc i sur., 2013.) i IBD-em (Franke i sur., 2010.). Stoga je glikozilacija IgG-a i metilacija gena *MGAT3* analizirana u istim pacijentima te su dobiveni podaci korelirani s ciljem identifikacije epigenetičke podloge promijenjene glikozilacije IgG-a u krvi pacijenata s IBD-em.

Razumijevanje molekularnih mehanizama koji dovode do razvoja IBD-a još uvijek je nepotpuno. Prema tome, poželjno je identificirati pouzdane molekularne neinvazivne biljege za ranu dijagnozu bolesti, kao i prognozu i odgovor pacijenata na terapiju (Vermeire i sur., 2006.). Stoga je drugi cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio utvrditi potencijal ova dva gena kandidata, *MGAT3* i *MGAT5*, kao dijagnostičkih biljega u krvi pacijenata s IBD-em.

Analizom uzoraka pune krvi pacijenata iz kohorti Edinburgh i Firenza je pokazano da postoji značajna razlika u metilaciji za neka analizirana CpG mjesta gena *MGAT3* i *MGAT5*. Opseg istraživanja i statistička značajnost rezultata upućuju da promjena CpG metilacije ovih gena ima potencijal dijagnostičkog biljega. Bock (2009.) predlaže analizu 100 ili više uzoraka te na neovisnim kohortama kako bi metilacija određenih gena imala potencijal biljega. Istraživanje provedeno u okviru ove doktorske disertacije je zadovoljilo oba navedena kriterija- metilacija gena kandidata analizirana je na više stotina uzoraka u dvije neovisne kohorte. Za analizu metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* korištena su dva metilacijska testa (koja su sadržavala ukupno 15 CpG mjesta), odnosno jedan metilacijski test (koji je sadržavao četiri CpG mjesta), te su zabilježene značajne razlike u stupnju metilacije za sva ili većinu CpG mjesta u krvi pacijenata s IBD-em. U drugoj neovisnoj kohorti ove su razlike potvrđene na još većem broju pacijenata- dobivene su slične vrijednosti stupnja metilacije i isti uzorak CpG metilacije. Međutim, kako su razlike između pacijenata i kontrola male, potrebno je provesti analizu metilacije upotrebom istih metilacijskih testova na barem još jednoj neovisnoj kohorti te u analizu uključiti još veći broj pacijenata i kontrolnih ispitanika. Tek tada bi se sa sigurnošću moglo govoriti o potencijalu dijagnostičkog biljega te bi bilo potrebno provesti i

računalne analize (primjerice upotrebom programa za validaciju biljega) kako bi se potvrdila metilacija DNA kao dijagnostički biljeg (Bock, 2009.).

Razlike u stupnju metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* u Crohnovoj bolesti (u odnosu na kontrolne ispitanike) bile su veće nego u ulceroznom kolitisu. Većina analiziranih CpG mjesta pokazala su povećani stupanj metilacije u Crohnovoj bolesti u odnosu na ulcerozni kolitis. Razlog tome može biti da je promjena metilacijskog statusa DNA u ovim bolestima posredovana (primarno) različitim tipovima DNA metiltransferaza s obzirom da je GWA studija identificirala *DNMT3A* kao rizični lokus za razvoj Crohnove bolesti (Franke i sur., 2010.), dok DNMT1 i DNMT3B imaju veću ekspresiju u pacijenata s ulceroznim kolitisom (Saito i sur., 2011.). Razlika u metilaciji između Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa bi se mogla objasniti i na način da neki (trenutno nedovoljno istraženi) mehanizmi u bolesti dovode do veće promjene metilacije gena u Crohnovoj bolesti u odnosu na ulcerozni kolitis. Također, promjene u glikanima IgG-a bile su izraženije u Crohnovoj bolesti u usporedbi s ulceroznim kolitisom (Trbojević Akmačić i sur., 2015.).

Metilacija gena *MGAT3* i *MGAT5* je analizirana na više stotina uzoraka iz kohorte Edinburgh za fragmente (metilacijske testove) koji su pokazali značajno promijenjenu metilaciju između pacijenata i kontrolnih ispitanika te su rezultati potvrđeni na još jednoj neovisnoj kohorti (Firenza), također na više stotina uzoraka. Slične studije koje su analizirale metilaciju DNA u IBD-u iz krvi (perifernu krv ili mononuklearnih stanica perifernu krv) su provedene na puno manjem broju uzoraka (više desetaka uzoraka) u odnosu na istraživanje provedeno u okviru ove doktorske disertacije (Adams i sur., 2014.; Balasa i sur., 2010.; Harris i sur., 2012.; Karatzas i sur., 2014.; McDermott i sur., 2016.; Nimmo i sur., 2012.). Iznimka je istraživanje koje su proveli Ventham i sur. (2016.), partneri na projektu IBD-BIOM, a uključivalo je analizu nekoliko stotina uzoraka.

Analiza CpG metilacije kandidata gena *MGAT3* i *MGAT5* provedena je na DNA izolirane iz stanica pune krvi pacijenata s IBD-em. Glavni cilj projekta FP7 IBD-BIOM, u sklopu kojeg je izrađena ova doktorska disertacija, je razvoj dijagnostičkih i prognostičkih molekularnih biljega za IBD koji još uvijek nedostaju za ove bolesti. Iako je metilacija DNA tkivno specifična, te je najvjerojatnije analizirati ju u specifičnom bolesnom tkivu, uzorkovanje tkiva (u ovom slučaju biopsija crijeva) predstavlja invazivnu metodu za pacijenta. Stoga je metoda uzorkovanja krvi manje invazivna za pacijenta, a izolacija DNA iz

krvi relativno je jednostavna. Također, prednost krvi kao uzorka za analizu metilacije DNA je što je ona u doticaju sa svim tkivima u organizmu (Levenson i Melnikov, 2012.). Dosadašnje studije, uglavnom provedene na malignim tumorima, pokazuju da metilacija DNA analizirana iz periferne krvi može biti dobar dijagnostički biljeg, rani prognostički biljeg i biljeg za uspješnost terapije (Esteller, 2008.; Koestler i sur., 2012.; Langevin i sur., 2012.; Lim i sur., 2008.; Moore i sur., 2008.; Teschendorff i sur., 2009.; Toperoff i sur., 2012.; Schulz, 2008.). Ipak, postoje i nedostaci krvi kao uzorka za analizu metilacije DNA. Prvo, obrazac metilacije DNA iz krvi ne mora nužno odgovarati obrascu metilacije DNA iz tkiva u kojem se odvija patogeneza. Drugi je problem što DNA iz krvi potječe od različitih staničnih tipova koji imaju vlastite obrasce metilacije (Reinius i sur., 2012.). Upravo zbog heterogenosti uzorka metilacije DNA staničnih tipova, rezultate je teško interpretirati. Nemoguće je znati da li je promijenjeni stupanj metilacije DNA u krvi posljedica hipo- ili hiper-metilacije koji se događa kao posljedica patogeneze svih stanica u krvi, ili pak promijenjenog sastava odnosno broja staničnih tipova u krvi kao posljedica bolesti. S obzirom da se smatra da upalne bolesti crijeva nastaju zbog neodgovarajućeg upalnog odgovora imunološkog sustava (Abraham i Cho, 2009.; Xavier i Podolsky, 2007.), bilo bi preciznije analizirati metilaciju DNA iz pojedinačnih staničnih tipova iz krvi, posebice onih uključenih u imunološki odgovor kao što su to neutrofili te B- i T-limfociti koji ujedno zauzimaju najveći udio leukocita (O'Connor, 1984.). Stanični tipovi bi se mogli razvrstati magnetnim kuglicama ili staničnim sorterom i analizirati metilacija DNA. U dijagnostičke svrhe bi se mogla analizirati metilacija DNA onog staničnog tipa koji pokaže najveću razliku u metilaciji u pacijenata s IBD-em, no ovakve analize zahtijevaju pravovremeno i pažljivo planiranje eksperimentalnog protokola unutar velikih konzorcija i kliničkih centara što je bio slučaj unutar projekta IBD-BIOM i doktorske disertacije izrađene u okviru tog projekta. Ovaj pristup je posebice koristan, ako su razlike u metilaciji iz krvi vrlo male između pacijenata i kontrolnih ispitanika.

U ovom istraživanju je pokazana značajna razlika u metilaciji DNA za dva od ukupno pet analiziranih fragmenata gena *MGAT3* te za jedan od ukupno sedam analiziranih fragmenata gena *MGAT5* između pacijenata s IBD-em i kontrolnih ispitanika. Najveći problem analize metilacije DNA metodom pirosekvenciranja, koja ima rezoluciju pojedinačnog CpG mjesta, jest odabir fragmenata (metilacijskih testova) unutar samog promotora određenog gena, odnosno identifikacija onih CpG mjesta unutar promotora, koji su relevantni za regulaciju ekspresije. Također, sve se više pristupa bioinformatičkoj analizi pronalaženja regulatornih regija i pojačivača određenog gena koji mogu biti udaljeni nekoliko

desetaka ili stotina kb od samog promotora, odnosno starta transkripcije tog određenog gena (Nardone i sur., 2004.). Stoga, nije jednostavno dizajnirati metilacijske testove za pirosekvenciranje koji će biti korisni u analizi promjene metilacije DNA. Ako se pomoću nekog metilacijskog testa ne pronađu razlike između pacijenata i kontrolnih ispitanika, to ne znači da gen, u kojem se nalazi analizirani fragment, nema promijenjenu metilaciju u bolesti, već jednostavno za analizu nisu bila odabrana CpG mjesta na kojima dolazi do promjene metilacije, a to su najčešće ona CpG mjesta koja su relevantna za funkciju gena. No, postoje određeni pristupi koji olakšavaju odabir CpG mjesta za analizu. Jedan od njih je istraživanje baze GEO koja sadrži podatke metilacije DNA iz periferne krvi i sluznice crijeva osoba koje boluju od IBD-a i zdravih osoba. U ovom istraživanju su odabrana ona CpG mjesta koja su pokazivala najveću promjenu u metilaciji između pacijenata s IBD-em i zdravih osoba. Samo jedno takvo CpG mjesto se nalazi unutar fragmenta 1 gena *MGAT3* i fragmenta 7 gena *MGAT5* te su ona pokazala značajne razlike u stupnju metilacije u pacijenata s IBD-em dviju analiziranih kohorti. Osim problema odabira CpG mjesta za analizu, kreiranje metilacijskih testova može otežati i dizajn početnica. Naime, ponekad nije moguće dizajnirati početnice na željenom mjestu u promotoru gena i samim time nije moguće analizirati metilaciju željene sekvence. Razlog tome je što se trebaju zadovoljiti određena pravila za dizajn početnica koja uključuju određenu duljinu i temperaturu taljenja početnica te da se u sastavu početnica ne nalaze citozini koji prethode gvaninima. Nažalost, najčešće se regulatorna CpG mjesta nalaze u regijama u promotoru u kojima je gustoća CpG dinukleotida velika i nemoguće je zadovoljiti kriterije za dizajn početnica i/ili dobiti PCR produkt koji prethodi pirosekvenciranju (Kohler i sur., 2016.)

Hipoteza ovog istraživanja je da je glikozilacija IgG-a u krvi pacijenata s IBD-em regulirana metilacijom DNA. Utjecaj epigenetičkih mehanizama u regulaciji *N*-glikozilacije proteina plazme i sekretoma animalnih staničnih kultura te *N*-glikana IgG-a pokazan je prijašnjim studijama (Horvat i sur., 2012.; Klasić i sur., 2016.; Menni i sur., 2013.; Saldova i sur., 2011.; Zoldoš i sur., 2012.). Kako bi se otkrila povezanost metilacije gena *MGAT3* u ovom radu i *N*-glikozilacije IgG-a, korelirani su podaci CpG metilacije i glikana IgG-a pacijenata s IBD-em i kontrolnih ispitanika. Iako se korelacijskim analizama ne mogu sa sigurnošću utvrditi uzročno-posljedične veze, analiza je pokazala povezanost metilacije gena *MGAT3* s određenim glikanskim strukturama na IgG-u. Metilacija CpG mjesta obuhvaćena s oba metilacijska testa gena *MGAT3* pozitivno je korelirala sa strukturom FA2 u obje analizirane kohorte uzoraka što ukazuje na mogućnost da je ova struktura uključena u dio

biosinteze glikana IgG-a povezana s aktivnošću produkta gena *MGAT3*. Također, metilacija oba fragmenta gena *MGAT3* korelirala je sa strukturom FA2B, iako slabije i samo u kohorti Edinburgh. Analiza je pokazala da povećana metilacija gena *MGAT3* negativno korelira s omjerom FA2B/FA2. Uzimajući u obzir ove podatke, očekivalo bi se da je omjer FA2B/FA2 smanjen u pacijenata s IBD-em, te da je udio strukture FA2 u IBD-u veći u odnosu na udio strukture FA2B. To ukazuje da je aktivnost enzima GnT-III (kodiran genom *MGAT3*) smanjena u IBD-u. Naime, GnT-III dodaje GlcNAc na  $\beta$ 1,4-vezanu manozu u srži od tri manoze strukture FA2 pri čemu nastaje FA2B. Kako je smanjen prijelaz strukture FA2 u FA2B, to upućuje na smanjenu aktivnost enzima GnT-III koji je odgovoran za tu reakciju. Smanjena aktivnost enzima upućuje na smanjenu ekspresiju gena *MGAT3*. Metilacija citozina (CpG otoka) unutar promotorske regije gena se povezuje s utišavanjem transkripcije (Illingworth i Bird, 2009.). Viši stupanj metilacije CpG mjesta obuhvaćenih fragmentima 1 i 2 gena *MGAT3*, koji se nalaze u promotoru ovoga gena, mogao bi imati utjecaj na smanjenje njegove ekspresije na što ukazuju korelacijske analize CpG metilacije i glikanskih struktura koje su direktni pokazatelj aktivnosti enzima GnT-III (kojeg kodira gen *MGAT3*). Međutim, na temelju ovih analiza može se samo pretpostaviti da je ekspresija gena *MGAT3* smanjena, odnosno da je njegova ekspresija regulirana metilacijom analiziranih CpG mjesta. Usporedba ekspresije gena *MGAT3* za iste ispitanike predstavljala bi jači argument za ulogu metilacije gena *MGAT3* u regulaciji glikozilacije IgG-a. Drugi autori (Trbojević Akmačić i sur., 2015.) su primjetili značajan porast strukture FA2B u ulceroznom kolitisu i Crohnovoj bolesti te porast udjela glikoformi koje sadrže rasijecajući GlcNAc ( $B_{total}$ ) u Crohnovoj bolesti. Ovakav rezultat upućuje da bi aktivnost enzima GnT-III (koji je odgovoran za te strukture) mogla biti povećana u IBD-u, a ne smanjena. Unatoč tome, takvi rezultati ne isključuju mogućnost da metilacija gena *MGAT3* regulira ekspresiju gena i time utječe na dodavanje rasijecajućeg GlcNAc na IgG. Metilacija gena *MGAT3* je slabo pozitivno korelirana sa strukturom FA2B (samo za fragment 2) i ne pokazuje značajnu povezanost za glikoforme koje sadrže rasijecajući GlcNAc ( $B_{total}$ ). Moguće je da uz metilaciju gena *MGAT3* i neki drugi mehanizmi utječu na zastupljenost struktura s rasijecajućim GlcNAc te da je zato njihov udio povećan u IBD-u. Negativna korelacija primjećena je između metilacije gena *MGAT3* i glikanskih struktura koje sadrže galaktozu. Strukture FA2G2 i FA2BG2 pokazale su negativnu korelaciju za oba fragmenta gena *MGAT3* u obje analizirane kohorte. Kada bi ekspresija gena *MGAT3* bila regulirana metilacijom analiziranih CpG mjesta, povećana metilacija bi dovela do smanjene ekspresije gena, pri čemu bi se moglo očekivati smanjenje udjela galaktoziliranih struktura. Također, struktura FA2G2S1 pokazala je negativnu korelaciju u obje analizirane

kohorte za fragment 1 te u kohorti Edinburgh za fragment 2. Ova struktura nastaje djelovanjem enzima ST6GalT1 na strukturu FA2G2 pa je moguće da je manje zastupljena u IBD-u jer je i struktura FA2G2 manje zastupljena u IBD-u. Na sličan način se može objasniti smanjeni udio galaktozilirane strukture FA2BG2 koja nastaje nadogradnjom strukture FA2BG1 koja je također manje zastupljena u IBD-u. Neobično je da struktura FA2 pokazuje pozitivnu korelaciju s metilacijom gena *MGAT3*, a FA2G1 negativnu korelaciju s obzirom da ova struktura nastaje dodatkom galaktoze na strukturu FA2 pomoću enzima GalT1. No, kakva je točno povezanost metilacije gena *MGAT3* te galaktozilacije (i sijalinizacije) IgG-a, nemoguće je zaključiti na temelju ovih korelacijskih analiza s obzirom da je glikozilacija veoma složen proces i da se radi o indirektnoj povezanosti dvaju mehanizama.

U ovom istraživanju su korelirani podaci metilacije gena *MGAT3* iz stanica pune krvi s podacima glikanskih struktura IgG-a iz plazme. Nedostatak ovog pristupa je što DNA potječe od različitih staničnih tipova koji imaju vlastite metilacijske profile (Reinius i sur., 2012.). Stoga, analizu CpG metilacije bi bilo korisnije napraviti samo iz plazma stanica te potom napraviti korelacijsku analizu podataka metilacije iz plazma stanica s podacima glikozilacije IgG-a. Na ovaj način bi se dobili precizniji rezultati korelacijske analize. U sklopu projekta IBD-BIOM, za iste pacijente bila je dostupna plazma za analizu glikozilacije IgG-a i puna krv za analizu metilacije DNA, no nisu bile dostupne plazma stanice.

Iako je u okviru ovog istraživanja analizirana metilacija gena *MGAT5* na DNA iz krvi pacijenata s IBD-em, nije napravljena korelacijska analiza podataka metilacije gena *MGAT5* s podacima glikozilacije IgG-a. Gen *MGAT5* kodira za enzim N-acetilglukozaminiltransferazu V (GnT-V) koji prenosi N-acetilglukozamin (GlcNAc) na  $\beta$ 1,6-vezanu manozu u srži od tri manoze *N*-glikana pri čemu nastaje razgranata struktura *N*-glikana koje nisu pronađene na Fc regiji molekula IgG-a (Trbojević Akmačić i sur., 2015.).

Upalne bolesti crijeva su karakterizirane neodgovarajućim upalnim odgovorom imunološkog sustava na crijevnu mikrofloru (Abraham i Cho, 2009.; Xavier i Podolsky, 2007.). Važnu ulogu u imunološkom sustavu imaju B-limfociti, ali uloga B-limfocita u IBD-u još uvijek nije dovoljno istražena (Abraham i Cho, 2009.). B-limfociti se u crijevu primarno nalaze u limfoidnim folikulama te kao plazma stanice u *lamini propriae*. Tijekom zdravog stanja, aktivacija mukoznih B-limfocita dovodi do aktivacije i diferencijacije u plazma stanice koje preferencijalno izlučuju imunoglobulin A (IgA). Postoje i aktivirani cirkulirajući



B-limfociti koji mogu biti aktivirani mukozni B-limfociti ili B-limfociti aktivirani u cirkulaciji putem bakterija ili bakterijskih antigena. U sluznici crijeva oboljelih od IBD-a, smanjeno je izlučivanje IgA, a povećano izlučivanje IgG-a. U eksperimentalnom modelu IBD-a je pokazana prisutnost cirkulirajućih antitijela koja reagiraju na vlastite i mikrobne antigene što podržava hipotezu da je deregulirani imunološki odgovor na normalnu crijevnu mikrofloru primarni patogeni događaj u IBD-u (Mizoguchi i Bhan, 2012.). Noronha i sur. (2009.) su pokazali da cirkulirajući B-limfociti luče proupalni IL-8 u pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti te je količina izlučenog IL-8 pozitivno korelirana s aktivnosti bolesti. Sve navedeno upućuje na to da B-limfociti imaju ulogu u patogenezi IBD-a. Stoga, korisno je istraživati mehanizme koji se odvijaju u ovom staničnom tipu kako bi se razumjelo na koji način je deregulacija ekspresije gena u B-limfocitima uključena u IBD. Lin i sur. (2012.) su pokazali da je metilacija genoma B-limfocita promijenjena u pacijenta koji boluju od IBD-a pri čemu su neki od gena imali ulogu u upalnom odgovoru. U okviru ove doktorske disertacije je analizirana metilacija gena *MGAT3* i *MGAT5* u B-limfocitima iz krvi pacijenata s IBD-em. Dok metilacija gena *MGAT5* nije bila promijenjena u B-limfocitima pacijenata s IBD-em, u pacijenata s Crohnovom bolesti metilacija gena *MGAT3* bila je promijenjena u B-limfocitima. S obzirom da je ova analiza metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* uključivala relativno mali broj uzoraka (oko 66, Tablica 1), potrebno je napraviti istraživanje na većem broju uzoraka kako bi bilo jasno je li promjena metilacije ovih gena u B-limfocitima uključena u IBD. Usporedbom obrasca metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* iz pune krvi i onog dobivenog iz B-limfocita, uočava se sličnost u obrascima metilacije za oba gena kandidata, iako se stupanj metilacije razlikovao između B-limfocita i pune krvi. Naime, većina CpG mjesta obuhvaćena metilacijskim testovima za gen *MGAT3* pokazuje viši stupanj metilacije u B-limfocitima, dok sva analizirana CpG mjesta obuhvaćena metilacijskim testom za gen *MGAT5* pokazuju niži stupanj metilacije u B-limfocitima. Na temelju ovih rezultata se može zaključiti da u slučaju gena *MGAT3* na obrazac metilacije u punoj krvi uz B-limfocite utječe stanični tip koji pokazuje niže vrijednosti metilacije u odnosu na B-limfocite, a u slučaju gena *MGAT5* stanični tip koji ima više vrijednosti metilacije.

U drugom dijelu istraživanja, analizirana je metilacija gena *MGAT3* i *MGAT5* u trećoj kohorti (Porto) koja nije bila uključena u projekt IBD-BIOM. Ovaj dio istraživanja napravljen je u suradnji sa Zavodom za gastroenterologiju u Portu, Portugal. Metilacija gena *MGAT3* i *MGAT5* analizirana je na DNA izoliranoj iz mononuklearnih stanica periferne krvi, CD3+ T-limfocita izoliranih iz krvi i CD3+ T-limfocita izoliranih tkiva crijeva s mjesta upale

pacijenata s ulceroznim kolitisom. Cilj je bio identificirati promjene metilacije ovih gena u ulceroznom kolitisu iz stanica imunološkog sustava iz tkiva koja bi trebala biti relevantnija za bolest, nego promjene identificirane iz pune krvi. Ispitalo se postoji li razlika u obrascu i stupnju metilacije iz T-limfocita iz krvi u usporedbi s metilacijom iz stanica krvi te u usporedbi s istim staničnim tipom iz tkiva crijeva s mjesta upale. Stupanj metilacije CpG mjesta obuhvaćenih metilacijskim testovima za gen *MGAT3* analiziran iz stanica krvi bio je povišen u ulceroznom kolitisu, no statistički neznačajno. S obzirom na vrlo mali broj uzoraka, nije moguće zaključiti o tome da li je metilacija gena *MGAT3* promijenjena u ulceroznom kolitisu u ovoj kohorti. Međutim, isti metilacijski testovi za gen *MGAT3* su pokazali značajno povišenu metilaciju u pacijenata s ulceroznim kolitisom analiziranu iz pune krvi u kohortama Edinburgh i Firenza što dodatno potvrđuje premalen broj uzoraka kohorte Porto.

Iako je broj uzoraka koji je analiziran u kohorti Porto jako malen, uspoređen je obrazac metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* u sve tri kohorte. Analiza metilacije na DNA iz pune krvi prikriva koji stanični tip najviše pridonosi promjeni CpG metilacije u bolesti. Usporedba rezultata metilacije iz tri istraživane kohorte bi mogla pružiti odgovor na to pitanje. Dok je CpG metilacija kohorti Edinburgh i Firenza analizirana iz pune krvi, u kohorti Porto analizirana je na DNA iz mononuklearnih stanica krvi. Mogući razlog razlike u stupnju metilacije ovih kohorti bi mogli biti neutrofili koji nisu prisutni u uzorcima iz kohorte Porto. Neutrofili zauzimaju najveći udio leukocita u krvi (O'Connor, 1984.) te je pokazano da je globalna metilacija neutrofila visoka i ne mijenja se tijekom njihovog razvoja. S druge strane, globalna metilacija B- i T-limfocita je sličnih vrijednosti kao i neutrofila u naivnim stadijima, no stupanj metilacije se smanjuje tijekom aktivacije i diferencijacije ovih staničnih tipova (Schuyler i sur., 2016.). Stoga, neutrofili bi mogli imati visok stupanj metilacije i biti razlog višeg stupnja metilacije u punoj krvi u odnosu na mononuklearne stanice krvi. Ujedno bi neutrofili mogli biti zaduženi za povećanu razinu metilacije u pacijenata s ulceroznim kolitisom. Partneri iz Edinburgha na projektu IBD-BIOM su analizirali broj pojedinih staničnih tipova u krvi pacijenata s IBD-em te su zabilježili povećanje broja neutrofila, a smanjenje udjela B- i T-limfocita (neobjavljeni rezultati). Stoga bi povećani broj neutrofila mogao pridonositi povećanom stupnju metilacije u punoj krvi. Nije isključena mogućnost da je i stupanj metilacije promijenjen u ovom staničnom tipu.

U ovom je istraživanju analizirana metilacija gena *MGAT3* i *MGAT5* iz pune krvi, mononuklearnih stanica krvi, te B- i T-limfocita, no te analize nisu rađene na istim pacijentima, niti na istom broju uzoraka. Stoga, međusobne usporedbe dobivenih rezultata nisu precizne. Najbolje rješenje bi bilo da se iz velikog broja istih pacijenata analizira CpG metilacija ovih gena iz pune krvi i pojedinih staničnih tipova te ujedno izmjeri njihov broj u krvi. Tada bi se sa sigurnošću moglo znati u kojim staničnim tipovima je došlo do promjene stupnja metilacije, odnosno da li je promjena stupnja metilacije u punoj krvi naprosto odraz promjene broja nekog staničnog tipa uslijed bolesti i dominacije njegovog obrasca metilacije.

Osim B-limfocita, važnu ulogu u imunološkom sustavu imaju i T-limfociti (Janeway Jr. i sur., 2001.). Tijekom zdravog stanja, T-limfociti (CD4+ i CD8+) su prisutni u malom broju u crijevu i to u *lamini propriae* (CD4+) i u epitelnom sloju crijeva (CD8+). Tijekom upalnog procesa je broj CD4+ T-limfocita često znatno povećan (Snapper i Nguyen, 2012.). Istraživanja upalnih bolesti crijeva u miševa i ljudi ukazuju na poremećenu regulaciju CD4+ T-limfocita tijekom patogeneze ovih bolesti (Abraham i Cho, 2009.). U Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu dolazi do povećane proizvodnje citokina IL-17 (Fujino i sur., 2003.). Pokazana je i povišena transkripcija gena IL-23 u pacijenata s Crohnovom bolesti (Schmidt i sur., 2005.). IL-23 pridonosi upali tkiva (Hue i sur., 2006.). U ovoj doktorskoj disertaciji je analizirana metilacija gena *MGAT3* i *MGAT5* u T-limfocitima iz krvi i T-limfocitima iz tkiva crijeva s mjesta upale u pacijenata s ulceroznim kolitisom. Samo jedno CpG mjesto od ukupno 15 CpG mjesta obuhvaćenih s dva metilacijska testa za gen *MGAT3* pokazalo je značajno viši stupanj metilacije na DNA iz T-limfocita u krvi. S druge strane, kada je metilacija gena *MGAT3* analizirana na DNA iz T-limfocita iz tkiva crijeva s upalom, većina CpG mjesta obuhvaćenih s dva metilacijska testa pokazala se značajno promijenjenom u pacijenata s aktivnim oblikom ulceroznog kolitisa, odnosno nekoliko CpG mjesta je imalo promijenjenu metilaciju u pacijenata s inaktivnim oblikom bolesti. Ulcerozni kolitis je upalna bolest koja zahvaća debelo crijevo i upravo analize metilacije *in situ* (u tkivu u kojem se događa upala) mogu dati najvjerođostojniji odgovor na pitanje da li je metilacija DNA uključena u patogenezu bolesti. Dobiveni rezultati na kohorti Porto ukazuju da se stupanj metilacije gena *MGAT3* smanjuje s većim stadijem ulceroznog kolitisa, iako se stadiji bolesti nisu pokazali značajno različitim. Istraživanje koje su proveli partneri na projektu IBD-BIOM, otkrilo je skupinu gena čija je metilacija promijenjena u T-limfocitima (Ventham i sur., 2016.).

Iako je broj uzoraka u analizi metilacije gena *MGAT3* iz T-limfocita iz krvi i stanica krvi bio malen, ipak su uspoređeni njihovi obrasci metilacije kako bi se dobio uvid u kojoj su mjeri ova dva obrasca slična. Obrazac metilacije gena *MGAT3* iz stanica krvi ne odgovara obrascu metilacije gena *MGAT3* iz T-limfocita- stupanj metilacije u T-limfocitima je bio niži što znači da uz ovaj stanični tip, neki drugi stanični tip koji ima viši stupanj metilacije na istim CpG mjestima, pridonosi ukupnoj metilaciji gena *MGAT3* mononuklearnih stanica krvi. U prilog tome govori i viši stupanj metilacije gena *MGAT3* dobiven na DNA izoliranoj iz B-limfocita (kohorta Edinburgh) u odnosu na T-limfocite.

Također je uspoređen obrazac metilacije gena *MGAT3* iz T-limfocita iz krvi s onim iz T-limfocita iz tkiva kako si se odgovorilo na pitanje da li je obrazac metilacije iz krvi informativan za bolest kod koje se upala odvija u tkivu crijeva. Kako su metode uzorkovanja tkiva invazivne za pacijenta, analiza metilacije DNA iz krvi je praktičnija i manje invazivna. Usporedbom ova dva obrasca metilacije, pokazalo se da metilacija gena *MGAT3* iz krvi ne odgovara metilaciji gena *MGAT3* iz tkiva. Stupanj metilacije u T-limfocitima iz krvi je značajno niži za većinu analiziranih CpG mjesta i u kontrolnih ispitanika i pacijenata s ulceroznim kolitisom. Ovakvi rezultati upućuju da metilacija gena *MGAT3* iz krvi nije reprezentativni uzorak za ono što se odvija *in situ*, u tkivu crijeva s upalom u ulceroznom kolitisu.

Metilacija gena *MGAT5* (jedan metilacijski test) nije bila promijenjena u krvi pacijenata s ulceroznim kolitisom iz kohorte Porto. S druge strane, isti metilacijski test gena *MGAT5* je pokazao značajne razlike između pacijenata s ulceroznim kolitisom i kontrolnih ispitanika u kohortama Edinburgh i Firenza što jasno pokazuje da su sve male studije (s malim brojem uzoraka) pogrešne, te da se za vjerodostojan rezultat studije mora uključiti više stotina, odnosno tisuća pacijenata. Iako je u okviru IBD-BIOM konzorcija sakupljeno više tisuća uzoraka (pacijenata), za ovu doktorsku disertaciju se odlučilo analizirati nekoliko stotina uzoraka iz praktičnih financijskih razloga. Ipak, na nekoliko stotina ljudi bilo je moguće dobiti pouzdane rezultate.

Uočena je mala razlika u stupnju metilacije gena *MGAT5* između kohorte Porto i kohorti Edinburgh/Firenza- stupanj metilacije u punoj krvi bio je malo viši za sve analizirane skupine, a razlog tome mogu biti neutrofili koji čine najveći udio leukocita u krvi (O'Connor, 1984.). Prijašnje studije su pokazale je da je globalna metilacija neutrofila visoka (Schuyler i

sur., 2016.). Također, zabilježen je porast njihovog broja u IBD-u, te smanjenje broja B- i T-limfocita (neobjavljeni rezultati partnera projekta IBD-BIOM). Moguće da neutrofili najviše pridonose stupnju ukupne metilacije iz pune krvi i uočenoj razlici metilacije u IBD-u. Osim što je moguće da je u bolesti promijenjen broj neutrofila, moguće je i da je sami stupanj metilacije promijenjen u ovom staničnom tipu.

Metilacija gena *MGAT5* u T limocitima iz krvi nije pokazala značajne razlike između pacijenata s ulceroznim kolitisom i kontrolnih ispitanika, kao niti između grupa pacijenata međusobno (inaktivni i aktivni oblik bolesti). Ipak, s obzirom na premalen broj uzoraka, ovaj rezultat nije pouzdan. Osim toga, analizirana je metilacija CpG mjesta obuhvaćenih samo jednim metilacijskim testom, stoga možda neka druga CpG mjesta unutar promotora ovoga gena imaju promijenjenu metilaciju u bolesti. U tkivu crijeva metilacija gena *MGAT5* bila je značajno promijenjena. U inaktivnom obliku ulceroznog kolitisa značajnu razliku pokazalo je samo jedno CpG mjesto, dok su u aktivnom obliku bolesti bila značajno promijenjena sva analizirana CpG mjesta. Značajno su promijenjena i dva CpG mjesta između ova dva oblika bolesti. Takvi rezultati ukazuju da bi metilacija gena *MGAT5* mogla biti uključena u patogenezu ulceroznog kolitisa te da se stupanj metilacije smanjuje s napredovanjem bolesti prema većim stadijima. Ovakvi rezultati su precizniji u odnosu na rezultate iz krvi jer je tkivo crijeva primarno mjesto na kojem se odvija upala (Abraham i Cho, 2009.)

Obrazac metilacije gena *MGAT5* iz T-limfocita iz krvi upoređen je s obrascem metilacije iz stanica krvi. S obzirom na relativno mali broj uzoraka te velike standardne devijacije u pojedinim ispitivanim skupinama, tek analizom većeg broja uzoraka bi se moglo dati preciznije objašnjenje rezultata. Metilacija u T-limfocitima iz krvi se ne razlikuje značajno u odnosu na stanice krvi u inaktivnom obliku ulceroznog kolitisa, no pokazuje značajno veću metilaciju za jedno ili dva CpG mjesta u aktivnom obliku bolesti i u kontrolnih ispitanika. Na temelju značajnih rezultata se može zaključiti da se obrazac metilacije DNA T-limfocita razlikuje od obrasca ukupne metilacije stanica krvi te da uz ovaj stanični tip, neki drugi stanični tip koji ima niži stupanj metilacije utječe na ukupni obrazac metilacije. Moguće je da su to B-limfociti jer se u ovom istraživanju pokazalo kako T-limfociti imaju viši stupanj metilacije u usporedbi sa stanicama krvi, a B-limfociti niži. Ujedno, limfociti zauzimaju najveći udio među mononuklearnim stanicama krvi (O'Connor, 1984.). Metilacija gena *MGAT5* nije bila promijenjena u ulceroznom kolitisu kada se analizirala na DNA iz B- i T-limfocita iz krvi, no bila je značajno promijenjena kada je analizirana u punoj krvi.

Također je uspoređen obrazac metilacije gena *MGAT5* u T-limfocitima iz krvi s onim iz T-limfocita iz tkiva. Dok u inaktivnom obliku ulceroznog kolitisa nisu uočene razlike, u pacijenata s aktivnim oblikom bolesti pronađene su značajne razlike za većinu ili za sva CpG mjesta što ponovno ukazuje da obrazac metilacije iz krvi ne predstavlja reprezentativno obrazac metilacije iz tkiva crijeva koji je zahvaćen bolešću.

Pacijenti unutar kohorte Porto se razlikuju prema primljenoj terapiji te su za ovo istraživanje bili dostupni podaci o terapiji za većinu pacijenata. Iako je ukupni broj pacijenata bio jako malen, napravljena je stratifikacija pacijenata prema terapiji na pacijente koji nisu dobili nikakvu terapiju, one koji su primali standardnu terapiju i na one koji su primali anti-TNF terapiju. U standardnu terapiju su bili uključeni 5-aminosalicilna kiselina te imunomodulatori metotreksat i azatioprin, a unutar anti-TNF terapije su korišteni adalimumab i infliximab. Na ovaj način bi se mogao dobiti uvid mijenja li se metilacija gena kandidata *MGAT3* i *MGAT5* pod utjecajem terapije. Prema dosadašnjoj literaturi, utjecaj navedenih vrsta terapije na metilaciju DNA je još uvijek nedovoljno istražen (Karatzas i sur., 2014b.). Metilacija fragmenta 7 gena *MGAT5* i fragmenta 1 gena *MGAT3* iz mononuklearnih stanica krvi nije pokazala značajne razlike s obzirom na terapiju, dok je metilacija jednog CpG mjesta unutar fragmenta 2 gena *MGAT3* bila značajno promijenjena između pacijenata sa standardnom i anti-TNF terapijom. U T-limfocitima iz krvi je zabilježena značajna razlika na dva CpG mjesta fragmenta 7 gena *MGAT5* i fragmenta 1 gena *MGAT3* između pacijenata koji su primili standardnu terapiju u odnosu na kontrolne ispitanike. Nasuprot tome, u T-limfocitima iz tkiva sva CpG mjesta gena *MGAT5* pokazuju značajne razlike između kontrolnih ispitanika i pacijenata koji nisu bili pod terapijom, ali i ostalih skupina pacijenata. Ovakvi rezultati su uočeni i za gen *MGAT3*, za četiri CpG mjesta u fragmentu 1 i za dva CpG mjesta u fragmentu 2. Ukoliko se uzmu u obzir samo ona CpG mjesta na kojima je uočena značajna razlika u metilaciji između pacijenata bez terapije i kontrolnih ispitanika, može se uočiti da je metilacija u pacijenata s neliječenim ulceroznim kolitisom smanjena u odnosu na kontrolne ispitanike te da se metilacija povećava pod utjecaje terapije. Metilacija ovih gena u pacijenata koji su primali standardnu odnosno anti-TNF terapiju nije se razlikovala značajno, ali je zabilježena značajna razlika u metilaciji većine CpG mjesta gena *MGAT5* između pacijenata koji nisu primili terapiju i onih koji su primili standardnu terapiju. Ovakvi rezultati ukazuju da terapija ima efekt na metilaciju gena *MGAT5*. Iako se međusobno skupine pacijenata ne razlikuju značajno za gen *MGAT3*, vidljiv je isti trend povećanja metilacije u pacijenata s terapijom u odnosu na pacijente bez terapije kao i u slučaju gena *MGAT5*.

Rezultati ovog dijela istraživanja sugeriraju da je metilacija promijenjena u ulceroznom kolitisu te da je reverzibilna pod utjecajem određene terapije. Ipak, ove rezultate se treba uzeti s oprezom zbog vrlo malog broja uzoraka, ali su obećavajući u nekoj većoj analizi brojnije kohorte.

Uz analizu metilacije DNA nekog gena potrebno je analizirati istovremeno i njegovu ekspresiju kako bi se utvrdilo da li je promjena metilacije na određenim CpG mjestima relevantna za transkripciju tog gena. U okviru projekta IBD-BIOM skupljena je samo DNA iz pune krvi pacijenata kohorti Edinburgh i Firenza te takva analiza nije mogla biti provedena. Za kohortu Porto bila je dostupna RNA izolirana iz T-limfocita iz krvi i iz tkiva crijeva te je analizirana ekspresija gena *MGAT5*.

Ekspresija gena *MGAT5* u T-limfocitima iz krvi nije pokazala značajne razlike između pacijenata s ulceroznim kolitisom i kontrolnim ispitanicima, kao niti između grupa pacijenata (inaktivni i aktivni oblik bolesti). S obzirom da je tkivo crijeva primarno mjesto na kojem se odvija upala u ulceroznom kolitisu, moguće je da se promjene u krvi ne mogu detektirati. Drugo objašnjenje bi bilo da je broj uzoraka premalen da bi se dobili relevantni rezultati. U T-limfocitima iz tkiva također nije uočena razlika u ekspresiji gena *MGAT5* između inaktivnog i aktivnog oblika ulceroznog kolitisa ili kontrolnih ispitanika, no ekspresija se značajno razlikovala u aktivnom obliku bolesti u odnosu na kontrolne ispitanike. Ovakvi rezultati su u skladu s već prije objavljenim rezultatima (Dias i sur., 2014.). Osim snižene razine ekspresije gena *MGAT5* u pacijentima s ulceroznim kolitisom, ovi su autori pokazali smanjenu razinu  $\beta$ 1,6-razgranatih *N*-glikana na receptorima T-limfocita (engl. *T-cell receptor*, TCR) u tkivu crijeva s upalom. Također, pacijenti s težim oblikom bolesti su imali najniže razine grananja u usporedbi s pacijentima koji su imali blaži ili inaktivni oblik bolesti. Za glikanske razgranate strukture je odgovoran enzim GnT-V kodiran genom *MGAT5*. Smanjena razina grananja *N*-glikana na TCR-ovima je prethodno povezana s povećanom aktivacijom T-limfocita i hiperimunim odgovorom (Slika 6) (Demetriou i sur., 2001.; Morgan i sur., 2004b.). Rezultati upućuju da smanjena ekspresija gena *MGAT5* dovodi do smanjene razine grananja *N*-glikana na TCR-ovima što za posljedicu ima promjenu imunološkog odgovora.

Kako bi se utvrdilo da li je metilacija CpG mjesta obuhvaćenih u metilacijskom testu gena *MGAT5* korištenim u ovim analizama povezana s promjenom transkripcije toga gena, uspoređeni su rezultati metilacije i rezultati ekspresije. U T-limfocitima iz tkiva crijeva s

upalom i ekspresija i metilacija gena *MGAT5* bila je smanjena u pacijenata s ulceroznim kolitisom. Pošto je u T-limfocitima iz tkiva u inaktivnom obliku bolesti metilacija bila promijenjena samo na jednom CpG mjestu fragmenta 7, usporedba između metilacije i ekspresije napravljena je samo za grupu pacijenata s aktivnim oblikom bolesti gdje je stupanj metilacije na svim analiziranim CpG mjestima bio promijenjen. Usporedba je pokazala da smanjeni stupanj CpG metilacije prati smanjena ekspresija gena *MGAT5*. CpG mjesta obuhvaćena metilacijskim testom korištenim u ovom radu za analizu metilacije gena *MGAT5* se nalaze u prvom intronu. Dok se metilacija citozina (CpG otoka) unutar promotorske regije povezuje s represijom transkripcije (Illingworth i Bird, 2009.), uloga metilacije CpG mjesta izvan promotorske regije još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Zhang i sur. (2010.) su pokazali da niži stupanj metilacije CpG mjesta unutar prvog introna gena dovodi do povećanja ekspresije gena. Nasuprot tome, Rauch i sur. (2009.) su uočili pozitivnu korelaciju između intragenske metilacije i ekspresije gena. Na temelju rezultata istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, ne može se sa sigurnošću tvrditi radi li se o regulatornim CpG mjestima gena *MGAT5*. Potrebno je analizirati puno veći broj uzoraka, nego je analiziran ovom studijom, te napraviti analizu na različitim animalnim stanicama u kulturi. Analiza metilacije i ekspresije nekog gena na više tipova stanica može pokazati da li metilacija i ekspresija uvijek koreliraju pozitivno (niža metilacija, niža ekspresija ili viša metilacija, viša ekspresija) što je indicacija da su analizirana CpG mjesta uključena u regulaciju transkripcije tog gena.



## 6. ZAKLJUČAK

- Metilacija gena *MGAT3* i *MGAT5* je značajno promijenjena u upalnim bolestima crijeva. Razlike su izraženije u krvi pacijenata s Crohnovom bolesti, nego pacijenata s ulceroznim kolitisom.
- Metilacija gena *MGAT3* i *MGAT5* izmjerena iz pune krvi pacijenata s IBD-em mogla bi imati potencijal dijagnostičkog biljega za Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis. S obzirom da samostalni efekt metilacije ovih gena nije velik, trebalo bi ih koristiti u kombinaciji s drugim biljezima- u tom kontekstu bi mogli povećati specifičnost i/ili osjetljivost dijagnostičkog testa.
- Promjena metilacije gena *MGAT3* (izmjerena u krvi) je u korelaciji s promjenama glikozilacije IgG-a (izmjerene u plazmi) u istim pacijentima s upalnim bolestima crijeva.
- Korelacijske analize upućuju na smanjenu ekspresiju gena *MGAT3* (kodira za enzim GnT-III) u IBD-u. Dobiveni podaci su konzistentni s pretpostavkom da analizirana CpG mjesta unutar promotorske regije gena *MGAT3* sudjeluju u regulaciji njegove ekspresije.
- S obzirom da metilacija gena *MGAT3* ne može objasniti svu varijabilnost glikanskih struktura uključenih u enzimsku reakciju GnT-III, regulacija i drugih gena uključenih u biosintezu glikana vjerojatno utječe na zastupljenost tih struktura.
- Metilacija gena *MGAT3* korelirana je sa strukturama IgG-a koje sadrže galaktozu i sijalinsku kiselinu, no na temelju provedenih analiza nije moguće identificirati točan mehanizam ove korelacije.
- Metilacija gena *MGAT3* analizirana u B-limfocitima bolesnika s Crohnovom bolesti (ali ne i bolesnika s ulceroznim kolitisom) promijenjena je u odnosu na kontrolne ispitanike te prati isti obrazac metilacije gena *MGAT3* analizirane iz pune krvi.
- Metilacija gena *MGAT3* i *MGAT5* promijenjena je u ulceroznom kolitisu u T-limfocitima iz tkiva crijeva s upalom, ali nije promijenjena u mononuklearnim stanicama krvi i T-limfocitima u krvi. Također, obrazac metilacije gena *MGAT3* i *MGAT5* dobiven iz krvi ne odgovara obrascu metilacije istih gena u tkivu crijeva s upalom.
- Ekspresija gena *MGAT5* nije promijenjena u T-limfocitima iz krvi pacijenata s ulceroznim kolitisom, ali je smanjena u T-limfocitima iz tkiva crijeva i to u pacijenata s aktivnim oblikom bolesti.

## 7. LITERATURA

- Abraham C i Cho JH (2009) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 361: 2066–2078.
- Abraham C i Medzhitov R (2011) Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 140: 1729–1737.
- Adams AT, Kennedy NA, Hansen R, Ventham NT, O’Leary KR, Drummond HE, i sur. (2014) Two-stage genome-wide methylation profiling in childhood-onset Crohn’s disease implicates epigenetic alterations at the VMP1/MIR21 and HLA loci. *Inflamm Bowel Dis* 20: 1784–1793.
- Akasaka-Manyá K, Manyá H, Sakurai Y, Wojczyk BS, Kozutsumi Y, Saito Y, i sur. (2010) Protective effect of N-glycan bisecting GlcNAc residues on  $\beta$ -amyloid production in Alzheimer’s disease. *Glycobiology* 20: 99–106.
- Al-Moundhri MS, Al-Nabhani M, Tarantini L, Baccarelli A, i Rusiecki JA (2010) The prognostic significance of whole blood global and specific DNA methylation levels in gastric adenocarcinoma. *PLoS One* 5: e15585.
- Amre DK, D’Souza S, Morgan K, Seidman G, Lambrette P, Grimard G, i sur. (2007) Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn’s disease in children. *Am J Gastroenterol* 102: 2016–2025.
- Ananthakrishnan AN (2015) Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12: 205–217.
- Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D’Amato M, Taylor KD, i sur. (2011) Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 43: 246–252.
- Andoh A, Imaeda H, Aomatsu T, Inatomi O, Bamba S, Sasaki M, i sur. (2011) Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn’s disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *J Gastroenterol* 46: 479–486.
- Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, i Dwek RA (2007) The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 25: 21–50.
- Balasa A, Gathungu G, Kisfali P, O’Brian Smith E, Cho JH, Melegh B, i sur. (2010) Assessment of DNA methylation at the interferon regulatory factor 5 (IRF5) promoter region in inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis* 25: 553–556.

- Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, i sur. (2008) Genome-wide association defines more than thirty distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 40: 955–962.
- Barrett JC, Lee J, Lees C, Prescott N, Anderson CA, Phillips A, i sur. (2009) Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet* 41: 1330–1334.
- Birchmeier W i Behrens J (1994) Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198: 11–26.
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6–21.
- Bird A (2011) The dinucleotide CG as a genomic signalling module. *J Mol Biol* 409: 47–53.
- Bird AP (1980) DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 1499–1504.
- Bock C (2009) Epigenetic biomarker development. *Epigenomics* 1: 99–110.
- Böhm S, Kao D, Nimmerjahn F (2014) Sweet and sour: the role of glycosylation for the anti-inflammatory activity of immunoglobulin G. U: Daëron M i Nimmerjahn F (eds.) *Fc Receptors*. Springer, Heidelberg, 393–418.
- Bolt S, Routledge E, Lloyd I, Chatenoud L, Pope H, Gorman SD, i sur. (1993) The generation of a humanized, non-mitogenic CD3 monoclonal antibody which retains in vitro immunosuppressive properties. *Eur J Immunol* 23: 403–411.
- Bonaz BL i Bernstein CN (2013) Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 144: 36–49.
- Castillo-Fernandez JE, Spector TD, Bell JT (2014) Epigenetics of discordant monozygotic twins: implications for disease. *Genome Med* 6: 60.
- Chassaing B i Darfeuille-Michaud A (2011) The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140: 1720–1728.
- Chen HL, Li CF, Grigorian A, Tian W, Demetriou M (2009) T cell receptor signaling co-regulates multiple Golgi genes to enhance N-glycan branching. *J Biol Chem* 284: 32454–32461.
- Chen ZX, Mann JR, Hsieh CL, Riggs AD, Chédin F (2005) Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *J Cell Biochem* 95: 902–917.
- Cheng X (1995) Structure and function of DNA methyltransferases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24: 293–318.

- Chu X, Pan C-M, Zhao S-X, Liang J, Gao G-Q, Zhang X-M, i sur. (2011) A genome-wide association study identifies two new risk loci for Graves' disease. *Nat Genet* 43: 897–901.
- Clamp JR, Fraser G, Read AE (1981) Study of the carbohydrate content of mucus glycoproteins from normal and diseased colons. *Clin Sci* 61: 229–234.
- Cortellino S, Xu J, Sannai M, Moore R, Caretti E, Cigliano A, i sur. (2011) Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* 146: 67–79.
- Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A (2011) Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140: 1785–1794.
- Cozen W, Li D, Best T, Van Den Berg DJ, Gourraud PA, Cortessis VK, i sur. (2012) A genome-wide meta-analysis of nodular sclerosing Hodgkin lymphoma identifies risk loci at 6p21.32. *Blood* 119: 469–475.
- Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW (2001) Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 409: 733–739.
- Dempster EL, Pidsley R, Schalkwyk LC, Owens S, Georgiades A, Kane F, i sur. (2011) Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet* 20: 4786–4796.
- Dias AM, Dourado J, Lago P, Cabral J, Marcos-Pinto R, Salgueiro P, i sur. (2014) Dysregulation of T cell receptor N-glycosylation: a molecular mechanism involved in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 23: 2416–2427.
- Dubé R, Rook GA, Steele J, Brealey R, Dwek R, Rademacher T, i sur. (1990) Agalactosyl IgG in inflammatory bowel disease: correlation with C-reactive protein. *Gut* 31: 431–434.
- Ek WE, D'Amato M, Halfvarson J (2014) The history of genetics in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* 27: 294–303.
- Esteller M (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358: 1148–1159.
- Fatemi M, Hermann A, Pradhan S, Jeltsch A (2001) The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J Mol Biol* 309: 1189–1199.
- Feil R i Fraga MF (2012) Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet* 13: 97–109.

- Fernandes B, Sagman U, Auger M, Demetrio M, Dennis JW (1991) Beta 1-6 branched oligosaccharides as a marker of tumor progression in human breast and colon neoplasia. *Cancer Res* 51: 718–723.
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13780–13785.
- Franke A, McGovern DPB, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, i sur. (2010) Meta-analysis increases to 71 the tally of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 42: 1118–1125.
- Friend PJ, Hale G, Chatenoud L, Rebello P, Bradley J, Thiru S, i sur. (1999) Phase I study of an engineered aglycosylated humanized CD3 antibody in renal transplant rejection. *Transplantation* 68: 1632–1637.
- Fu J, Wei B, Wen T, Johansson ME V, Liu X, Bradford E, i sur. (2011) Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest* 121: 1657–1666.
- Fujii S, Nishiura T, Nishikawa A, Miura R, Taniguchi N (1990) Structural heterogeneity of sugar chains in immunoglobulin G. Conformation of immunoglobulin G molecule and substrate specificities of glycosyltransferases. *J Biol Chem* 265: 6009–6018.
- Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, i sur. (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52: 65–70.
- Gardiner-Garden M i Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196: 261–282.
- Garner OB i Baum LG (2008) Galectin–glycan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signalling. *Biochem Soc Trans* 36: 1472–1477.
- Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD (2008) DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res* 647: 30–38.
- Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S, Doolittle WF, Veldhuyzen Van Zanten SJO (2006) Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol* 44: 4136–4141.
- Gornik O i Lauc G (2008) Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers* 25: 267–278.
- Gornik O, Pavić T, Lauc G (2012) Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta* 1820: 1318–1326.

- Gowher H i Jeltsch A (2002) Molecular enzymology of the catalytic domains of the DNMT3A and DNMT3B DNA methyltransferases. *J Biol Chem* 277: 20409–20414.
- Gowher H, Liebert K, Hermann A, Xu G, Jeltsch A (2005) Mechanism of stimulation of catalytic activity of DNMT3A and DNMT3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J Biol Chem* 280: 13341–13348.
- Goyal R, Reinhardt R, Jeltsch A (2006) Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 34: 1182–1188.
- Harris RA, Nagy-Szakal D, Pedersen N, Opekun A, Bronsky J, Munkholm P, i sur. (2012) Genome wide peripheral blood leukocyte DNA methylation microarrays identified a single association with inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 18: 2334–2341.
- Häsler R, Feng Z, Bäckdahl L, Spehlmann ME, Franke A, Teschendorff A, i sur. (2012) A functional methylome map of ulcerative colitis. *Genome Res* 22: 2130–2137.
- Heyn H, Carmona Javier F, Gomez A, Ferreira HJ, Bell JT, Sayols S, i sur. (2013) DNA methylation profiling in breast cancer discordant identical twins identifies DOK7 as novel epigenetic biomarker. *Carcinogenesis* 34: 102–108.
- Hoefkens E, Nys K, John JM, Van Steen K, Arijs I, Van Der Goten J, i sur. (2013) Genetic association and functional role of Crohn disease risk alleles involved in microbial sensing, autophagy, and endoplasmic reticulum (ER) stress. *Autophagy* 9: 2046–2055.
- Holmén Larsson JM, Karlsson H, Crespo JG, Johansson ME V, Eklund L, Sjövall H, i sur. (2011) Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 17: 2299–2307.
- Horvat T, Mužinić A, Barišić D, Bosnar MH, Zoldoš V (2012) Epigenetic modulation of the HeLa cell membrane N-glycome. *Biochim Biophys Acta* 1820: 1412–1419.
- Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, i sur. (2006) Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 203: 2473–2483.
- Illingworth RS i Bird AP (2009) CpG islands - “A rough guide.” *FEBS Lett* 583: 1713–1720.
- Jair K-W, Bachman KE, Suzuki H, Ting AH, Rhee I, Yen R-WC, i sur. (2006) De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer Res* 66: 682–692.
- Janeway Jr. CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2001) Basic concepts in immunology. U: Austin P i Lawrence E (eds.) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Publishing, New York, 1–38.

- Johansson ME V, Sjövall H, Hansson GC (2013) The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10: 352–361.
- Jones PA (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13: 484–492.
- Jones PA i Liang G (2009) Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 10: 805–811.
- Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, i sur. (2012) Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491: 119–124.
- Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A (2011) Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *ChemBioChem* 12: 206–222.
- Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch J V (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 313: 670–673.
- Karatzas PS, Mantzaris GJ, Safioleas M, Gazouli M (2014a) DNA methylation profile of genes involved in inflammation and autoimmunity in inflammatory bowel disease. *Medicine* 93: e309.
- Karatzas PS, Gazouli M, Safioleas M, Mantzaris GJ (2014b) DNA methylation changes in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* 27: 125–132.
- Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, i sur. (2012) Galactosylated IgG1 links FcγRIIB and Dectin-1 to block complement-mediated inflammation. *Nat Med* 18: 1401–1406.
- Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS (2010) Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 28: 573–621.
- Kelly DR i Alenghat T (2016) Epigenomic of intestinal disease. U: Tollefsbol T (ed.) *Medical Epigenetics*. Elsevier Inc., London, 257–273.
- Khor B, Gardet A, Xavier RJ (2011) Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474: 307–317.
- Kinnucan JA, Rubin DT, Ali T (2013) Sleep and inflammatory bowel disease: exploring the relationship between sleep disturbances and inflammation. *Gastroenterol Hepatol* 9: 718–727.
- Kizuka Y i Taniguchi N (2016) Enzymes for N-glycan branching and their genetic and nongenetic regulation in cancer. *Biomolecules* 6: E25.

- Klasić M, Krištić J, Korać P, Horvat T, Markulin D, Vojta A, i sur. (2016) DNA hypomethylation upregulates expression of the MGAT3 gene in HepG2 cells and leads to changes in N-glycosylation of secreted glycoproteins. *Sci Rep* 6: 24363.
- Klimasauskas S, Kumar S, Roberts RJ, Cheng X (1994) HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* 76: 357–369.
- Koestler DC, Marsit CJ, Christensen BC, Accomando W, Langevin SM, Houseman EA, i sur. (2012) Peripheral blood immune cell methylation profiles are associated with non-hematopoietic cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21: 1293–1302.
- Kohler RS, Anugraham M, Núñez López M, Xiao C, Schoetzau A, Hettich T, i sur. (2016) Epigenetic activation of MGAT3 and corresponding bisecting GlcNAc shortens the survival of cancer patients. *Oncotarget* 7: 51674–51686.
- Kohli RM i Zhang Y (2013) TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502: 472–479.
- Krapp S, Mimura Y, Jefferis R, Huber R, Sondermann P (2003) Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J Mol Biol* 325: 979–989.
- Langevin SM, Koestler DC, Christensen BC, Butler RA, Wiencke JK, Nelson HH, i sur. (2012) Peripheral blood DNA Methylation profiles are indicative of head and neck squamous cell carcinoma: An Epigenome-wide association study. *Epigenetics* 7: 291–299.
- Lauc G, Huffman JE, Pučić M, Zgaga L, Adamczyk B, Mužinić A, i sur. (2013) Loci associated with N-glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and haematological cancers. *PLoS Genet* 9: e1003225.
- Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsigos A, Ong CT, i sur. (2010) Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res* 20: 320–331.
- Leonhardt H, Page AW, Weier H-U, Bestor TH (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71: 865–873.
- Levenson VV (2010) DNA methylation as a universal biomarker. *Expert Rev Mol Diagn* 10: 481–488.
- Levenson VV i Melnikov AA (2012) DNA methylation as clinically useful biomarkers—light at the end of the tunnel. *Pharmaceuticals* 5: 94–113.
- Li E i Bird A (2007) DNA methylation in mammals. U: Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D (eds.) *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 341–356.



- Li Y-W, Kong F-M, Zhou J-P, Dong M (2014) Aberrant promoter methylation of the vimentin gene may contribute to colorectal carcinogenesis: a meta-analysis. *Tumor Biol* 35: 6783–6790.
- Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, i sur. (2002) Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* 22: 480–491.
- Lim U, Flood A, Choi S-W, Albanes D, Cross AJ, Schatzkin A, i sur. (2008) Genomic methylation of leukocyte DNA in relation to colorectal adenoma among asymptomatic women. *Gastroenterology* 134: 47–55.
- Lin Z, Hegarty JP, Yu W, Cappel JA, Chen X, Faber PW, i sur. (2012) Identification of disease-associated DNA methylation in B cells from Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Dig Dis Sci* 57: 3145–3153.
- Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, i sur. (2015) Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet* 47: 979–986.
- Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E (2013) DNA methylation in inflammatory bowel disease and beyond. *World J Gastroenterol* 19: 5238–5249.
- Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S (2006) Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 81: 1462–1471.
- Marek KW, Vijay IK, Marth JD (1999) A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology* 9: 1263–1271.
- Marth JD i Grewal PK (2008) Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* 8: 874–887.
- McDermott E, Ryan EJ, Tosetto M, Gibson D, Burrage J, Keegan D, i sur. (2016) DNA methylation profiling in inflammatory bowel disease provides new insights into disease pathogenesis. *J Crohns Colitis* 10: 77–86.
- McGovern DPB, Jones MR, Taylor KD, Marcianti K, Yan X, Dubinsky M, i sur. (2010a) Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease. *Hum Mol Genet* 19: 3468–3476.
- McGovern DPB, Gardet A, Törkvist L, Goyette P, Essers J, Taylor KD, i sur. (2010b) Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet* 42: 332–337.

- Menni C, Keser T, Mangino M, Bell JT, Erte I, Akmačić I, i sur. (2013) Glycosylation of immunoglobulin G: role of genetic and epigenetic influences. *PLoS One* 8: e82558.
- Métivier R, Gallais R, Tiffocche C, Le Péron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, i sur. (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452: 45–50.
- Mikeska T i Craig JM (2014) DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. *Genes* 5: 821–864.
- Mishkin S (1997) Dairy sensitivity, lactose malabsorption, and elimination diets in inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nutr* 65: 564–567.
- Miwa HE, Song Y, Alvarez R, Cummings RD, Stanley P (2012) The bisecting GlcNAc in cell growth control and tumor progression. *Glycoconj J* 29: 609–618.
- Miyahara K, Nouse K, Saito S, Hiraoka S, Harada K, Takahashi S, i sur. (2013) Serum glycan markers for evaluation of disease activity and prediction of clinical course in patients with ulcerative colitis. *PLoS One* 8: e74861.
- Mizoguchi A i Bhan AK (2012) Immunobiology of B cells in inflammatory bowel disease. U: Baumgart DC (ed.) *Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: From Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic Approach*. Springer, New York, 161–168.
- Moore LE, Pfeiffer RM, Poscablo C, Real FX, Kogevinas M, Silverman D, i sur. (2008) Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *Lancet Oncol* 9: 359–366.
- Moran AP, Gupta A, Joshi L (2011) Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut* 60: 1412–1425.
- Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn A V (2012) Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 448–462.
- Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK (2004a) Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* 279: 52353–52360.
- Morgan R, Guoyan Gao, Pawling J, Dennis JW, Demetriou M, Li B (2004b) N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5)-mediated N-glycosylation negatively regulates Th1 cytokine production by T cells. *J Immunol* 173: 7200–7208.
- Moss AC (2015) Optimizing the use of biological therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Rep* 3: 63–68.

- Nardone J, Lee DU, Ansel KM, Rao A (2004) Bioinformatics for the “bench biologist”: how to find regulatory regions in genomic DNA. *Nat Immunol* 5: 768–774.
- Naylor S (2003) Biomarkers : current perspectives and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn* 3: 525–529.
- Neurath MF (2017) Current and emerging therapeutic targets for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14: 269-278.
- Nile CJ, Read RC, Akil M, Duff GW, Wilson AG (2008) Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58: 2686–2693.
- Nimmo ER, Prendergast JG, Aldhous MC, Kennedy NA, Henderson P, Drummond HE, i sur. (2012) Genome-wide methylation profiling in Crohn’s disease identifies altered epigenetic regulation of key host defense mechanisms including the Th17 pathway. *Inflamm Bowel Dis* 18: 889–899.
- Noronha AM, Liang Y, Hetzel JT, Hasturk H, Kantarci A, Stucchi A, i sur. (2009) Hyperactivated B cells in human inflammatory bowel disease. *J Leukoc Biol* 86: 1007–1016.
- O’Connor BH (1984) The peripheral blood differential cell count. U: O’Connor BH (ed.) *A Color Atlas and Instruction Manual of Peripheral Blood Cell Morphology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 15–36.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, i sur. (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* 411: 603–606.
- Ohtsubo K i Marth JD (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126: 855–867.
- Okano M (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19: 219–220.
- Ooi SKT, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, i sur. (2007) DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* 448: 714–717.
- Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, i sur. (1985) Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 316: 452–457.
- Payne SR (2010) From discovery to the clinic: the novel DNA methylation biomarker (m)SEPT9 for the detection of colorectal cancer in blood. *Epigenomics* 2: 575–585.

- Pinho SS i Reis CA (2015) Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 15: 540–555.
- Pinho SS, Figueiredo J, Cabral J, Carvalho S, Dourado J, Magalhães A, i sur. (2013) E-cadherin and adherens-junctions stability in gastric carcinoma: Functional implications of glycosyltransferases involving N-glycan branching biosynthesis, N-acetylglucosaminyltransferases III and V. *Biochim Biophys Acta* 1830: 2690–2700.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf SK, Manichanh C, i sur. (2010) A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59–65.
- Rauch TA, Wu X, Zhong X, Riggs AD, Pfeifer GP (2009) A human B cell methylome at 100-base pair resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 671–678.
- Rehman A, Lepage P, Nolte A, Hellmig S, Schreiber S, Ott SJ (2010) Transcriptional activity of the dominant gut mucosal microbiota in chronic inflammatory bowel disease patients. *J Med Microbiol* 59: 1114–1122.
- Reinius LE, Acevedo N, Joerink M, Pershagen G, Dahlén SE, Greco D, i sur. (2012) Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. *PLoS One* 7: e41361.
- Relton CL i Smith GD (2010) Epigenetic epidemiology of common complex disease: prospects for prediction, prevention, and treatment. *PLoS Med* 7: e1000356.
- Rubin DT i Hanauer SB (2000) Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12: 855–862.
- Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA (2001) Glycosylation and the immune system. *Science* 291: 2370–2376.
- Saito S, Kato J, Hiraoka S, Horii J, Suzuki H, Higashi R, i sur. (2011) DNA methylation of colon mucosa in ulcerative colitis patients: correlation with inflammatory status. *Inflamm Bowel Dis* 17: 1955–1965.
- Saldiva R, Dempsey E, Pérez-Garay M, Mariño K, Watson JA, Blanco-Fernández A, i sur. (2011) 5-AZA-2'-deoxycytidine induced demethylation influences N-glycosylation of secreted glycoproteins in ovarian cancer. *Epigenetics* 6: 1362–1372.
- Schmidt C, Giese T, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Marth T, Zeuzem S, i sur. (2005) Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 11: 16–23.
- Schmittgen TD i Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3: 1101–1108.

- Schroeder Jr. HW i Cavacini L (2010) Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 125: S41–S52.
- Schulz WA (2008) Do DNA-methylation changes also occur in blood? *Lancet Oncol* 9: 312–313.
- Schuyler RP, Merkel A, Raineri E, Altucci L, Vellenga E, Martens JHA, i sur. (2016) Distinct trends of DNA methylation patterning in the innate and adaptive immune systems. *Cell Rep* 17: 2101–2111.
- Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN (2010) Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 105: 2687–2692.
- Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, Velcich A, Meijerink JPP, Van Goudoever JB, i sur. (2006) Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131: 117–129.
- Snapper SB i Nguyen DD (2012) Immunobiology of T cells in inflammatory bowel disease. U: Baumgart DC (ed.) *Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: From Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic Approach*. Springer, New York, 151–159.
- Sompayrac L (2012) An overview. U: Sompayrac L (ed.) *How the Immune System Works*. John Wiley & Sons, Ltd., Oxford, 1–12.
- Sonnenberg A (1990) Occupational distribution of inflammatory bowel disease among German employees. *Gut* 31: 1037–1040.
- de Souza HSP i Fiocchi C (2016) Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13: 13–27.
- Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S (2008) Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis* 14: 968–976.
- Stahl E, Raychaudhuri S, Remmers E, Xie G, Eyre S, Thomson B, i sur. (2010) Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet* 42: 508–514.
- Stanley P (2002) Biological consequences of overexpressing or eliminating N-acetylglucosaminyltransferase-TIII in the mouse. *Biochim Biophys Acta* 1573: 363–368.

- Stowell SR, Ju T, Cummings RD (2015) Protein glycosylation in cancer. *Annu Rev Pathol* 10: 473–510.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, Engelhardt H, Bengmark S, Koch S, i sur. (2007) Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* 56: 343–350.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, i sur. (2009) Conversion of 5-Methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324: 930–935.
- Takahashi M, Kuroki Y, Ohtsubo K, Taniguchi N (2009) Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of the N-glycan core: their functions and target proteins. *Carbohydr Res* 344: 1387–1390.
- Takahashi M, Kizuka Y, Ohtsubo K, Gu J, Taniguchi N (2016) Disease-associated glycans on cell surface proteins. *Mol Aspects Med* 51: 56–70.
- Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Gayther SA, Apostolidou S, i sur. (2009) An epigenetic signature in peripheral blood predicts active ovarian cancer. *PLoS One* 4: e8274.
- Testa R, Vanhooren V, Bonfigli AR, Boemi M, Olivieri F, Ceriello A, i sur. (2015) N-Glycomic changes in serum proteins in type 2 diabetes mellitus correlate with complications and with metabolic syndrome parameters. *PLoS One* 10: e0119983.
- Theodoratou E, Campbell H, Ventham NT, Kolarich D, Pučić-Baković M, Zoldoš V, i sur. (2014) The role of glycosylation in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11: 588–600.
- Toperoff G, Aran D, Kark JD, Rosenberg M, Dubnikov T, Nissan B, i sur. (2012) Genome-wide survey reveals predisposing diabetes type 2-related DNA methylation variations in human peripheral blood. *Hum Mol Genet* 21: 371–383.
- Trbojević Akmačić I, Ventham NT, Theodoratou E, Vučković F, Kennedy NA, Krištić J, i sur. (2015) Inflammatory bowel disease associates with proinflammatory potential of the immunoglobulin G glycome. *Inflamm Bowel Dis* 21: 1237–1247.
- Ventham NT, Kennedy NA, Adams AT, Kalla R, Heath S, O’Leary KR, i sur. (2016) Integrative epigenome-wide analysis demonstrates that DNA methylation may mediate genetic risk in inflammatory bowel disease. *Nat Commun* 7: 13507.
- Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P (2006) Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 55: 426–431.

- Vučković F, Krištić J, Gudelj I, Teruel M, Keser T, Pezer M, i sur. (2015) Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome. *Arthritis Rheumatol* 67: 2978–2989.
- Williams C, Panaccione R, Ghosh S, Rioux K (2011) Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol* 4: 237–248.
- Xavier RJ i Podolsky DK (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448: 427–434.
- Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, i sur. (1999) Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402: 187–191.
- Yang X, Tang J, Rogler CE, Stanley P (2003) Reduced hepatocyte proliferation is the basis of retarded liver tumor progression and liver regeneration in mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase III. *Cancer Res* 63: 7753–7759.
- Yang X, Han H, Carvalho DD De, Lay FD, Jones PA, Liang G (2014) Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell* 26: 577–590.
- Yoshimura M, Nishikawa A, Ihara Y, Taniguchi S, Taniguchi N (1995) Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8754–8758.
- Yoshimura M, Ihara Y, Matsuzawa Y, i Taniguchi N (1996a) Aberrant glycosylation of E-cadherin enhances cell-cell binding to suppress metastasis. *J Biol Chem* 271: 13811–13815.
- Yoshimura M, Ihara Y, Ohnishi A, Ijuhin N, Nishiura T, Kanakura Y, i sur. (1996b) Bisecting N-acetylglucosamine on K562 cells suppresses natural killer cytotoxicity and promotes spleen colonization. *Cancer Res* 56: 412–418.
- Zenlea T i Peppercorn MA (2014) Immunosuppressive therapies for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 20: 3146–3152.
- Zhang Y-Z i Li Y-Y (2014) Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol* 20: 91–99.
- Zhang X, Wu M, Xiao H, Lee M-T, Levin L, Leung Y-K, i sur. (2010) Methylation of a single intronic CpG mediates expression silencing of the PMP24 gene in prostate cancer. *Prostate* 70: 765–776.

- Zhao Y, Nakagawa T, Itoh S, Inamori KI, Isaji T, Kariya Y, i sur. (2006) N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on alpha3beta1 integrin-mediated cell migration. *J Biol Chem* 281: 32122–32130.
- Zoldoš V, Horvat T, Novokmet M, Cuenin C, Mužinić A, Pučić M, i sur. (2012) Epigenetic silencing of HNF1A associates with changes in the composition of the human plasma N-glycome. *Epigenetics* 7: 164–172.



## 8. ŽIVOTOPIS

**Dora Markulin** rođena je 24. listopada 1987. godine. Diplomirala je molekularnu biologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2011. godine s temom „Ovisnost količine DNA-traga o dobi i spolu donora na predmetima različite teksture”.

Od 2011. do 2012. godine radi u Aachenu u Njemačkoj kao istraživač na Sveučilištu RWTH i Institutu za biomedicinske tehnologije. Od 2013. godine, zaposlena je kao istraživač u tvrtki Genos d.o.o. u Zagrebu. Iste godine, zapošljava se u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka PMF-a kao znanstvena novakinja-asistentica na FP7 projektu IBD-BIOM pod vodstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš. Istovremeno upisuje doktorski studij Biologije na PMF-u i izrađuje doktorski rad s temom „Uloga CpG metilacije gliko-gena *MGAT3* i *MGAT5* te glikozilacije imunoglobulina G u upalnim bolestima crijeva”.

Objavila je u koautorstvu tri znanstvena rada u časopisima s međunarodnom recenzijom, od kojih su dva indeksirana u bazi CC. Sudjelovala je na nekoliko međunarodnih znanstvenih skupova s usmenim i posterskim izlaganjima.

Vodila je praktičnu nastavu iz kolegija Epigenetika, Genetika i Laboratorijska stručna praksa, te je bila neposredni voditelj tri diplomska rada.

Dobitnica je ISABS 2013 Young Investigator Award za istraživanje Markulin D, Gršković B, Marijanović I, Popović M, Mršić G (2013) Relation of touch DNA from different surfaces with donor age and gender, 8th ISABS Conference in Forensic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine.